

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Direktor: Professor Dr. R. Duesberg

**Über die Elimination von Erythrozyten
aus der Blutbahn von Kaninchen
nach Vorbeladung mit radioaktiven Schwermetallen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Johannes Gutenberg-Universität

Mainz

Vorgelegt von

Klaus Bangard

aus Siegen

Mainz 1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Direktor: Professor Dr. R. Duesberg

**Über die Elimination von Erythrozyten
aus der Blutbahn von Kaninchen
nach Vorbeladung mit radioaktiven Schwermetallen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Vorgelegt von
Klaus Bangard
aus Siegen

Mainz 1967



Dekan:	Professor Dr. Dr. Thews
Referent:	Privatdozent Dr. Fischer
Korreferat:	Professor Dr. Duesberg

Meinen lieben Eltern in
Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung: Die Milzszintigraphie als klinische Anwendung der Elimination von Erythrozyten aus der Blutbahn	1
II. Methodik	
II.1. Versuchsdurchführung und Markierungs- technik bei den In-vitro-Versuchen	4
II.2. Durchführung der In-vivo-Versuche an Kaninchen	6
II.3. Angewandte statistische Methodik	13
III. Ergebnisse	
III.1. In-vitro-Versuche	
III.1.1. Inkubation und Elution in Ab- hängigkeit von der Lagerungs- zeit	24
III.1.2. Inkubation und Elution in Ab- hängigkeit von der Temperatur	26
III.1.3. Einfluß einer Vorbehandlung mit isotonischer NaCl-Lösung (Waschen) auf Inkubations- und Elutionsverlauf	28
III.1.4. Einfluß eines Zusatzes von $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bzw. $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ als Trägersubstanz auf Inkubations- und Elutions- verlauf mit und ohne Waschen	30
III.1.5. Markierung mit $^{110\text{m}}\text{Ag}$ bei $\text{Ag}(\text{NH}_3)\text{Cl}$ als Trägerzusatz mit und ohne KJ-Zusatz	32
III.1.6. Inkorporation von ^{203}Hg und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ bei Leukozyten	33
III.2. In-vivo-Versuche	
III.2.1. Zeitabhängige Elimination von mit ^{203}Hg bzw. $^{110\text{m}}\text{Ag}$ markier- ten und alterierten Erythrozy- ten aus der Blutbahn	39
III.2.2. Simultanmarkierung mit $^{197}\text{Hg}/$ ^{51}Cr bzw. $^{110\text{m}}\text{Ag}/^{51}\text{Cr}$	41
III.2.3. Einfluß eines Zusatzes von $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bzw. $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ auf die Elimination der Erythrozy- ten aus der Blutbahn	43

III.2.4. Markierungsversuche mit ^{59}Fe	44
III.2.5. Verteilung der aufgenommenen Radioaktivität auf die ver- schiedenen Organe	48
IV. Diskussion der Ergebnisse	
IV.1. In-vitro-Versuche	58
IV.2. In-vivo-Versuche	66
V. Zusammenfassung	73
Literaturverzeichnis	75

I. Einleitung

Die Elimination von alterierten Erythrozyten aus der Blutbahn ist eine Clearance dieser Zellen in einem geschlossenen System, das als wesentliche Elemente das Blut, die Milz und das extralienale, retikulo-histiozytäre System (RHS) umfaßt. Werden die Erythrozyten radioaktiv markiert, so erweist sich deren Anreicherung in der Milz als derart hoch, daß eine szintigraphische Darstellung des Organs möglich ist (21). Diese Form der Darstellung der Milz wurde erstmals 1960 von Johnson, Herion und Mooring (47) sowie von Winkelman, Wagner, McAfee und Mozley (87) beschrieben und von Fischer und Wolf (25-29) an über 3 000 Fällen an der hiesigen Klinik erprobt und in Richtung auf eine quantitative Erfassung der Milzfunktion weiterentwickelt. Zuvor ließ sich keine der für die Milz oder das RHS angenommenen Funktionen quantitativ angeben.

Die Voraussetzung, die dieser Darstellungsmethode zugrundeliegt, besteht in der Beobachtung, daß Erythrozyten mit radioaktivem Chrom (^{51}Cr) irreversibel markiert werden (39). Nachdem diese Markierungstechnik zur Blutvolumen- und Erythrozytenlebenszeitbestimmung mit Erfolg eingesetzt (23,60) und aus Organaktivitätsmessungen wertvolle Hinweise über den Abbauort der Erythrozyten erhalten wurden (36,42,46,66,74), erkannte man die Möglichkeit einer szintigraphischen Darstellung der Milz mit Hilfe von künstlich alterierten Erythrozyten. Die Präparation der Erythrozyten erfolgt hierbei in zwei Arbeitsgängen:

1. Markierung der Erythrozyten mit $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$.
2. Alteration der Erythrozyten: Die Methode der Wahl ist die Wärmealteration (25-29,45,91,92). Andere Verfahren, wie die Beladung von Rh-positiven.

Erythrozyten mit inkompletten Rh-Antigenen, haben sich nicht durchsetzen können (47).

Für die Praxis weist die Methode der Milzszintigraphie mittels ^{51}Cr -markierter, wärmealterierter Erythrozyten den Nachteil auf, daß die Präparation der Erythrozyten (Markierung und Alteration) mit 90 Minuten zeitlich aufwendig ist. Wagner et.al. beschrieben 1963 eine Methode zur Milzszintigraphie, die wesentlich effektiver ist. Markierung und Alteration der Erythrozyten erfolgen innerhalb weniger Minuten durch die Einwirkung einer organischen Quecksilberverbindung, des 1-Bromomercuri-2-hydroxypropan (BMHP) (80,81). Der radioaktive Indikator ist hier ^{197}Hg . Diese Substanz wurde, bevor sie noch kommerziell erhältlich war, von Mundschenk im Radiochemischen Labor der Klinik synthetisiert (57,58a) und von Fischer, Mundschenk und Wolf zur Milzszintigraphie benutzt. Seither wird die BMHP-Methode wegen ihrer Einfachheit an vielen Stellen zur simultanen Milz- und Nierenszintigraphie angewendet (57,76,43).

Es lag nun nahe, weitere Versuche in der eingeschlagenen Richtung vorzunehmen und einige Elemente der sog. H_2S -Gruppe, insbesondere $^{110\text{m}}\text{Ag}$ und ^{203}Hg , auf ihre Anwendbarkeit bei nuklearmedizinischen Untersuchungen zu überprüfen:

1. Sind neben den in der klinischen Forschung und Diagnostik bereits verwendeten Radionukliden ^{51}Cr , ^{32}P , ^{14}C u.a. die Isotope $^{110\text{m}}\text{Ag}$ und ^{203}Hg bzw. ^{197}Hg zur Markierung und Alteration der Erythrozyten geeignet?

2. Wie schnell werden die mit diesen Isotopen beladenen Erythrozyten aus der Blutbahn eliminiert?

3. Wie verteilt sich die Radioaktivität auf die verschiedenen Organe?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden nachstehende Versuche durchgeführt:

In-vitro-Versuche

1. Inkubation und Elution in Abhängigkeit von der Lagerungszeit und Temperatur,
2. Einfluß einer Vorbehandlung mit isotonischer NaCl-Lösung auf Inkubations- und Elutionsverlauf,
3. Einfluß eines Zusatzes von $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bzw. $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ als Trägersubstanz auf Inkubations- und Elutionsverlauf,
4. Markierung mit $^{110\text{m}}\text{Ag}$ bei $\text{Ag}(\text{NH}_3)\text{Cl}$ als Träger-substanz, mit und ohne KJ-Zusatz,
5. Inkorporation von ^{203}Hg und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ bei Leukozyten.

In-vivo-Versuche

1. Zeitabhängige Elimination von mit ^{203}Hg bzw. $^{110\text{m}}\text{Ag}$ markierten und alterierten Erythrozyten aus der Blutbahn,
2. Simultanmarkierung mit $^{197}\text{Hg}/^{51}\text{Cr}$ bzw. $^{110\text{m}}\text{Ag}/^{51}\text{Cr}$,
3. Einfluß eines Trägerzusatzes von $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bzw. $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ auf die Elimination der Erythrozyten aus der Blutbahn,
4. Versuche mit ^{59}Fe -Markierung,
5. Verteilung der aufgenommenen Radioaktivität auf die verschiedenen Organe.

II. Methodik

II.1

Versuchsdurchführung und Markierungstechnik bei den In-vitro-Versuchen

Um die optimalen Bedingungen der Beladung von Erythrozyten mit den verwendeten Isotopen für die Tierversuche zu ermitteln, wurde zunächst der Einfluß verschiedener Versuchsparameter auf den Inkubations- und Elutionsverlauf an frischen Rindererythrozyten geprüft.

Die Untersuchungen erfolgten mit den Verbindungen Quecksilberchlorid ($^{203}\text{HgCl}_2$ bzw. $^{197}\text{HgCl}_2$), Silbercyanid ($[\text{}^{110\text{m}}\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$) und Chromat ($^{51}\text{CrO}_4^{--}$). Diese Nuklide wurden in steriler Lösung mit einer spezifischen Aktivität von 20 bis 200 mC/mg aus Amersham (England) bezogen. Durch Zusatz von isotonischer NaCl-Lösung wurde eine Stammlösung mit einem pH-Wert von 6,5-7,5 hergestellt.

Das zur Untersuchung verwendete frische Rinderblut wurde mit 100 ml ACD-Lösung*) pro 500 ml versetzt. Die Inkubation erfolgte in Plasma- oder NaCl-Suspension:

1. Inkubation in Plasmasuspension:

20 ml Vollblut (Hämatokrit ca. 40 %) wurden in einen Erlenmeyerkolben von 100 ml überführt, mit ca. 10 μC Radioaktivität versetzt und in Abhängigkeit von der Zeit bei Zimmertemperatur (22°C) inkubiert. Nach Abständen von 5, 15, 30, 60 usw. Minuten wurden jeweils 2,5 ml Vollblut in Glasröhrchen (90x11 mm) einpipettiert, anschließend 5 Minuten zentrifugiert (3000 Upm) und die Erythrozyten mit aliquoten Volumina von isotonischer NaCl-Lösung sukzessive zweimal gewaschen.

*) ACD-Stabilisator der Firma Braun, Melsungen.

2. Inkubation in NaCl-Suspension

Zur Entfernung der Plasmaphase wurde 5 Minuten bei 3500 Upm zentrifugiert und entweder mit einer aliquoten Menge isotonischer NaCl-Lösung versetzt (NaCl-Suspension) oder hiermit mehrmals gewaschen (Waschen).

Der Einfluß folgender Parameter: Lagerungszeit, Temperatur, Trägerzusatz u.a. wurden in den Plasma- oder NaCl-Suspensionen bzw. in mehrmals gewaschenen Erythrozyten-suspensionen eingehend untersucht.

Die Verteilung von $^{203}\text{HgCl}_2$ und $[\text{}^{110\text{m}}\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ prüften wir bei Leukozyten in mehreren Parallelversuchen. Im einzelnen verfahren wir wie folgt:

1. Je 2x100 ml Vollblut wurden bei 20°C 30 Min. mit 5 ml Inkubationslösung (20 μC) inkubiert und anschließend 8 Min. bei 2500 Upm zentrifugiert.
2. Die Leukozyten beider 100 ml-Gläser wurden in einem 2,5 ml-Westergreen-Röhrchen vereinigt und zentrifugiert.
3. Die so erhaltene Leukozytenfraktion wurde abgehoben und sodann deren Volumen und Radioaktivität bestimmt.

Grundsätzlich führte längeres Zentrifugieren bei 3000 Upm zu einem Zusammenballen der Zellen. Durch Zugabe von Azetat-Ionen kann dies weitgehend verhindert werden (79).

Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Gewinnung reiner Leukozytenfraktionen (1,10,12,61) kamen wegen der Vollblutinkubation nicht in Frage.

II.2

Durchführung der In-vivo-Versuche an Kaninchen

II.2.1

Elimination der markierten und alterierten Erythrozyten aus der Blutbahn

Aus der Ohrvene des Kaninchens wurden 2,0 bis 3,0 ml Blut entnommen, mit ACD ungerinnbar gemacht, das Plasma durch Zentrifugation abgetrennt, die Radioaktivität (ca. 22 μ C pro Tier) zugegeben und 45 Min. inkubiert. Anschließend wurde die Inkubation durch Zentrifugation (2200 Upm) unterbrochen, der Überstand abgehoben, das Plasma resuspendiert, auf 5 ml aufgefüllt (isotonische NaCl-Lösung) und reinjiziert. Nach 5, 15, 30, 45 usw. Minuten wurden Blutproben aus der Vene des anderen Ohres entnommen. Diese Entnahme erfolgte direkt in heparinisierte Mikrohämatokritröhrchen (MRH), welche zugeschmolzen, zentrifugiert und gemessen wurden. Dadurch konnte der Versuchsfehler erheblich gesenkt werden.

Die Messung der einzelnen Proben erfolgte in einem Einkanalgerät mit NaJ-Bohrlochkristall der Firma Picker. Da Erythrozyten, Überstände und Plasma unter gleichen Bedingungen gemessen wurden, entfielen jegliche Korrekturen (Höhen-, Geometrie- und Absorptionskorrektur). Aus den gemessenen Werten konnten nach Abzug des Null-effektes die einzelnen Impulsraten ermittelt werden.

II.2.2

Trägerversuche

Unter sonst gleichen Bedingungen wurde, um die Gefahr der Hämolyse, die bei Trägerzusatz erhöht ist, zu verringern, in Vollblut inkubiert. Die Inkubationszeit von ^{51}Cr (50 μ C/ml Erythr.) betrug 15 Min., die des Trägers ($\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bzw. $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$, der nach dem radioaktiven

Isotop zugegeben wurde, 7,5 Min. Nach beendeter Inkubation wurde zentrifugiert, der Überstand (Plasma und NaCl) verworfen, mit isotonischer NaCl-Lösung aufgefüllt und reinjiziert.

II.2.3

Simultanmarkierung

Die Versuchsbedingungen entsprechen denen von 1. bzw. 2. Von den Radioaktivitäten wurde ^{51}Cr jeweils zuerst, dann ^{197}Hg bzw. $^{110\text{m}}\text{Ag}$ zugegeben.

II.2.4

Verteilung der Radioaktivität auf die verschiedenen Organe

Nach der Injektion der markierten und alterierten Erythrozyten wurden die Versuchstiere getötet, sezziert und Gewicht sowie Aktivität der Gewebe und Proben bestimmt. Hieraus ließ sich die relative, spezifische Aktivität der einzelnen Organe mit und ohne Trägerzusatz ermitteln.

Außer den in den Tabellen 9-12 angegebenen Proben wurden Muskulatur, Knochen, Thymus und Lymphknoten auf Radioaktivität untersucht.

A. Auswertung der Versuche bei der Einfachmarkierung

Zur Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen wurde in unserem Labor eine Methode entwickelt, die eine Bestimmung der Erythrozytenvolumina von 0,005 bis 0,010 ml wie folgt durchzuführen gestattete (58a):

Die spezifische Erythrozytenaktivität A_s errechnet sich aus der gemessenen und korrigierten Impulsrate I

und dem Erythrozytenvolumen V_E nach folgender Beziehung:

$$A_S = \frac{I}{V_E} \text{ Imp/min, ml.}$$

Ermittlung des Erythrozytenvolumens: Zwei Tropfen Blut wurden aus der Ohrvene des Kaninchens mit einem MHR entnommen, das MHR zugeschnolzen, zentrifugiert und so- dann der Erythrozytenstand gemessen. Das Volumenergab sich durch Multiplikation des Erythrozytenstandes mit dem spezifischen Volumen ($\mu\text{l/cm}$) des MHR. Das Prinzip dieser Bestimmung beruht darauf, daß eine konisch ausgezogene und mit äquidistanten, willkürlichen Markierungen versehene Glasspitze in das MHR eingeführt wird. Aus der Eindringtiefe kann nach vorausgegangener Eichung (Abb.1) empirisch auf das spezifische Volumen geschlossen werden.



Abb.1. Eichkurve zur Ermittlung des spezifischen Volumens der MHR. Ordinate: Willkürliche Maßeinheiten der Glasspitze. Abszisse: Spezifisches Volumen der MHR.

B. Auswertung der Versuche bei der Simultanmarkierung

Da es sich bei der Simultanmarkierung um eine Markierung derselben Erythrozyten mit zwei Nukliden (z.B. ^{51}Cr und ^{197}Hg) gleichzeitig handelt, muß dieselbe Blutprobe zweimal - je einmal für jedes Isotop - mit einem Einkanalgerät bei entsprechender Diskriminatorstellung gemessen werden. Letztere erhält man, indem man die Spektren der Isotope aufnimmt (Abb.2), und die zur Messung der beiden Nuklide günstigste Diskriminatorstellung auswählt.

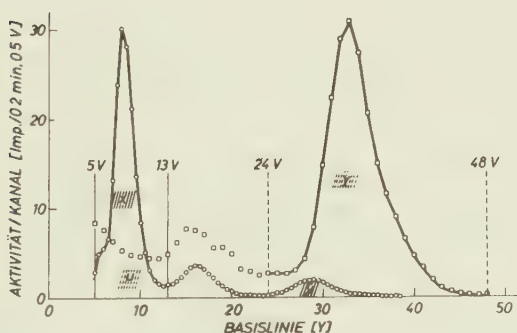


Abb.2. γ -Spektren der Isotope ^{51}Cr und ^{197}Hg , gemessen mit einem Einkanalgerät (Fa. Picker) in folgenden Einstellungen:

^{51}Cr : Verstärkung $V = 1$; Hochspannung $HV = 460 \text{ V}$; Basislinie $E_0 = 24 \text{ V}$; Fenster $\Delta E = 24 \text{ V}$.

^{197}Hg : $V = 1$; $HS = 460 \text{ V}$; $E_0 = 5 \text{ V}$; $\Delta E = 8 \text{ V}$.

Die Formel zur Umrechnung der gezählten Impulse auf Impulse des betreffenden reinen Isotops erhält man durch Ableitung der mathematischen Beziehungen wie folgt

(58a): Gemessen wird in Stellung I: $x + u = s_1$ bzw. in Stellung II: $y + v = s_2$. Mit reinen Aktivitätsproben (^{51}Cr und ^{197}Hg) werden die Beteiligungskoeffizienten (Anteile von ^{51}Cr im ^{197}Hg -Kanal und umgekehrt) ermittelt*):

$$\frac{v}{x} = K_1 \quad (^{197}\text{Hg})$$

$$\frac{u}{y} = K_2 \quad (^{51}\text{Cr})$$

Daraus erhält man das zur Berechnung von x und y benötigte Gleichungssystem:

$$x + u = s_1 \quad (1)$$

$$y + v = s_2 \quad (2)$$

$$\frac{v}{x} = K_1 \quad (3)$$

$$\frac{u}{y} = K_2 \quad (4)$$

Durch Einsetzen von (3) und (4) in (1) und (2) läßt sich vereinfachen:

$$x + yK_2 = s_1 \quad (5)$$

$$y + xK_1 = s_2 \quad (6)$$

Hieraus erhält man für x , y , u und v :

$$x = \frac{s_1 - s_2 K_2}{1 - K_1 K_2} \quad y = \frac{s_2 - s_1 K_1}{1 - K_1 K_2}$$

$$u = K_2 \frac{s_2 - s_1 K_1}{1 - K_1 K_2} \quad v = K_1 \frac{s_2 - s_1 K_1}{1 - K_1 K_2}$$

*) x : Integrale Peakimpulsrate von ^{51}Cr .
 y : Integrale Peakimpulsrate von ^{197}Hg .
 u : Untergrund von ^{197}Hg im ^{51}Cr -Kanal.
 v : Untergrund von ^{51}Cr im ^{197}Hg -Kanal.

II.2.5 Versuche mit ^{59}Fe -Markierung

Die bei den vorliegenden Untersuchungen angewandte Methode gestattete die Markierung einer diskreten Altersstufe mit ^{59}Fe innerhalb einer heterogenen Erythrozytenpopulation. Hierdurch konnte eindeutig geprüft werden, wie diese derart markierte Zellfraktion (Alter: $T \leq 6$ Tage) bei der sich anschließenden fraktionierten Zentrifugation und osmotischen Resistenzprüfung im Vergleich zu älteren Zellen sich verhält (58a): Kaninchen wurde ^{59}Fe ($1,5 \mu\text{C}$ pro Tier) in 3 ml isotonischer NaCl-Lösung injiziert, in festgelegten Zeitabständen (5, 30, 120, 240 usw. Minuten) Blutproben dem Tier entnommen, durch Zentrifugation Plasma und Erythrozyten getrennt, die Aktivitäten beider Anteile gesondert gemessen (bis zum 7. Tag) und die spezifischen Aktivitäten von Erythrozyten und Plasma errechnet.

Nach 6 Tagen, nachdem der größte Teil der ^{59}Fe -Aktivität in die Erythrozyten eingebaut war, wurden die Tiere getötet und pro Tier jeweils ca. 80 ml Blut gewonnen. Das Blut, das nur max. 6 Tage alte, mit ^{59}Fe markierte Erythrozyten enthalten konnte, wurde zu folgenden Versuchen verwendet:

A. Anreicherung der markierten Zellen durch Zentrifugation

1. Zentrifugation bei 1000 Upm (Zentrifuge: Christ, Typ UC3)

a) 9 Glasröhrchen (90x11 mm) wurden mit Blut (2 ml) beschickt und 5 Minuten zentrifugiert (1000 Upm) - Anreicherung I. Stufe - die spez. Aktivität des oberen (unteren) Drittels der Erythrozyten eines jeden der 9 Röhrchen gemessen und die Erythrozyten sodann gleichmäßig auf 3 weitere Ht.-Röhrchen verteilt (Abb.3).

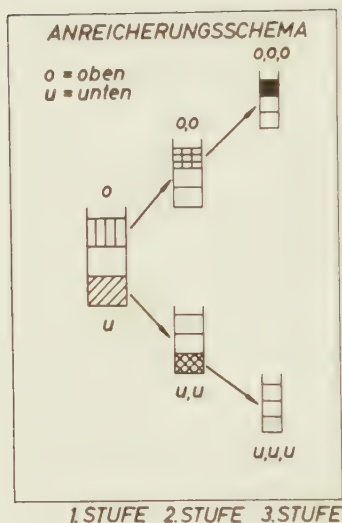


Abb.3. Schema zur Anreicherung der jungen, mit ^{59}Fe markierten Erythrozyten, im oberen Drittel des Zentrifugenglases, durch fraktionierte Zentrifugation bei konstanter Umdrehungszahl.

b) Diese 3 Ht.-Röhrchen wurden, wie in a) zentrifugiert, die Aktivität gemessen - Anreicherung II. Stufe - und die oberen (unteren) Drittel in ein engeres Röhrchen überführt.

c) Dieses Röhrchen wurde der gleichen Behandlung unterworfen - Anreicherung III. Stufe - so daß sich durch das Verhältnis der spez. Aktivität des ooo-Drittels zu der Aktivität der Ausgangsprobe die Gesamtanreicherung ergab (s.S. 45).

2. Zentrifugation bei 3500 Upm (Zentrifuge: Christ, Typ UC 3)

Gleiche Versuchsanordnung wie 1., jedoch Auftrennung bei höherer Umdrehungszahl.

3. Zentrifugation bei 11000 Upm (Zentrifuge: IEC, Mod. MB)

18 MHR wurden mit ^{59}Fe -markiertem Blut beschickt und in gleicher Weise bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert und aufgearbeitet.

B. Verhalten der mit ^{59}Fe markierten Zellen bei der fraktionierten Hämolyse

Zentrifugengläser (50 ml) wurden mit 50 ml der verschieden (0,1 % bis 0,99 %) konzentrierten NaCl-Lösungen beschickt, dazu 0,5 ml des ^{59}Fe -markierten Vollblutes gegeben, vorsichtig durchmischt und nach 35 Min. bei 2000 Upm zentrifugiert.

Die Messung des Hämolysegrades erfolgte im Überstand photometrisch bei 578 nm.

Als Leerwert galt der Überstand der 0,8 %-Lösung. Der Meßwert von 0,1 % entspricht 100 % Hämolyse. Gleichzeitig wurde der im Überstand auftretende Aktivitätsanteil ermittelt und auf die insgesamt vorliegende Aktivität der Probe bezogen.

II.3.

Angewandte statistische Methodik (16,30,51,52,83)

An statistischen Methoden kamen zur Anwendung:

1. Standardabweichung des Mittelwertes,
2. Doppelte Varianzanalyse,
3. Doppelte Varianzanalyse mit Wiederholungen,
4. Korrelations- und Regressionsanalyse,
5. Kovarianzanalyse.

Diese Methoden sollten folgende Probleme klären:

1. Statistische Signifikanz der zeitabhängigen Aktivitätsveränderung der In-vitro- und In-vivo-Versuche,
2. Statistische Signifikanz der behandlungsabhängigen Aktivitätsveränderung der In-vitro-Versuche,
3. Besteht eine unterschiedliche Einbaugeschwindigkeit bei den einzelnen In-vitro-Versuchen, falls die Erythrozyten verschieden vorbehandelt (Waschen, Träger u.a.) sind?
4. Sind diese behandlungsabhängigen Unterschiede der Einbaugeschwindigkeiten statistisch signifikant?
5. Statistische Signifikanz der Änderung der Elimination von Erythrozyten aus der Blutbahn, bei steigendem Zusatz von Trägersubstanz,
6. Statistische Signifikanz der Unterschiede der relativen spezifischen Organaktivitäten,
7. Größe des Versuchsfehlers.

Ad 1. Signifikanz der zeitabhängigen Aktivitätsveränderungen

Die Prüfung, ob die Zu- bzw. Abnahme der Aktivität mit der Zeit bei In-vitro- bzw. In-vivo-Versuchen statistisch signifikant ist, erfolgte mit der Methode der doppelten Varianzanalyse, Koller (51).

Die dabei angewandten Symbole bedeuten:

- i = Hauptgruppen (Meßwerte der einzelnen Zeiten)
- k = Untergruppen (Wiederholungsversuch)
- $\bar{x}_i$ = Durchschnitt der Beobachtungswerte je Untergruppe
- $\bar{x}_j$ = Durchschnitt der Beobachtungswerte je Hauptgruppe
- $\bar{x}_{ij}$ = Einzeldurchschnitt in Haupt- und Nebengruppe.

Tab.1. Grundschemata der doppelten Varianzanalyse (nach Koller 1964).

Untergruppen $i(1,k)$	Hauptgruppen $j_1(1,1)_2 \dots j.l$	Summe	Mittelwert
1	$x_{11} x_{12} \dots x_{1j} x_{1l}$	$x_{1.}$	$\bar{x}_{1.}$
2	$x_{21} x_{22} \dots x_{2j} x_{2l}$	$x_{2.}$	$\bar{x}_{2.}$
.		...	...
.		...	...
i	$x_{i1} x_{i2} \dots x_{ij} x_{il}$	$x_{i.}$	$\bar{x}_{i.}$
.		...	...
.		...	...
k	$x_{k1} x_{k2} \dots x_{kj} x_{kl}$	$x_{k.}$	$\bar{x}_{k.}$
Summe	$x_{.1} x_{.2} \dots x_{.j} x_{.l}$	x	
Mittelwert	$\bar{x}_{.1} \bar{x}_{.2} \dots \bar{x}_{.j} \bar{x}_{.l}$		$\bar{x}$

Tab.2. Prüfung des Inkubationsverlaufs von $Hg(Cl)_2$ in Plasmasuspension nach obigem Schema.

	5' x_{ij}	15' x_{ij}	30' x_{ij}	60' x_{ij}	120' x_{ij}	240' x_{ij}
1	1,137	1,268	1,295	1,372	1,439	1,552
2	1,155	1,263	1,312	1,400	1,481	1,597
3	1,140	1,260	1,289	1,380	1,455	1,562
4	1,140	1,261	1,289	1,389	1,464	1,574

Die sich daraus ergebenden Endresultate sind nachfolgend nummeriert, so daß die in Tabelle 3 dargestellten Summen der Abweichungsquadrate leicht abgeleitet werden können:

$$x = 32,474$$

$$\frac{x^2}{n} = 43,9400 \quad (1); \quad \sum_{ij} x_{ij}^2 = 44,3029 \quad (2)$$

$$\frac{\sum_j x^2 \cdot j}{1} = 44,4020 \quad (3); \quad \sum_i x_{i1}^2 = 43,9419 \quad (4)$$

Tab.3. Darstellung der SAQ und MAQ aus der doppelten Varianzanalyse.

Art der Streuung		SAQ	FG	MAQ
zwischen den Zeiten	(3)-(1)	0,4620	$\frac{(1-1)}{5}$	0,0924
zwischen den Versuchen	(4)-(1)	0,0019	$\frac{(2-1)}{3}$	0,0006
Restvarianz (Versuchsfehler)	$\frac{(2)+(1)-(3)-(4)}{15}$	0,0990	$\frac{(k-1) \times (1-1)}{15}$	0,0066
Gesamtvarianz	(2)-(1)	0,5629	$\frac{(n-1)}{23}$	

Daraus lassen sich F_1 und F_2 errechnen:

$$F_1 = \frac{\text{MAQ(Zeit)}}{\text{MAQ-Rest}} = 14,00; \quad F_2 = \frac{\text{MAQ(Versuche)}}{\text{MAQ(Restvar.)}} = 0,09$$

F_1 erweist sich als signifikanz, da $P < 1 \%$

F_2 ist nicht statistisch gesichert, da $P > 5 \%$.

Somit weicht der Unterschied zwischen den Zeiten, 5, 15, 30 Min. usw, innerhalb einer Behandlung (Plasmasuspension) deutlich von dem Versuchsfehler ab, während der Unterschied zwischen den Wiederholungsversuchen weit unterhalb des Versuchsfehlers bleibt.

Schlußfolgerungen:

Der aus der Summe der Abweichungsquadrate innerhalb der Untergruppen, sowie der dazugehörigen Freiheitsgraden gewonnene Wert, gilt als Schätzung für die bei dieser Versuchsmethode vorliegende Exaktheit der beobachte-

ten Meßergebnisse. Dieser Wert ist mit 0,0006 im Vergleich zur Gesamtvarianz, die als mittlere Abweichungsquadratsumme bei 0,5629 liegt, sehr klein. Damit sind wahrscheinlich alle bei Anwendung dieser Methode festgestellten Abweichungen von den Optimalwerten auf die Streuung durch biologische Untersuchungsobjekte (Erythrozyten von verschiedenen Rindern) zu beziehen. Die Berechnung des Versuchsfehlers ergibt, daß dieser signifikant von den Unterschieden zwischen den Zeiten abweicht. Das bedeutet, daß die bei steigender Zeit gemessenen höheren Impulsraten nicht durch den beschriebenen Versuchsfehler oder die unterschiedliche Herkunft der Erythrozyten hervorgerufen ist, sondern als Effekt der längeren Inkubationszeit angesehen werden muß. Mittels dieser Methode wurde innerhalb einer jeden Behandlung (Plasma-, NaCl-Suspension, Waschen, Träger usw.) die Frage der Signifikanz der zeitabhängigen Aktivitätsveränderung geprüft.

Ad.2. Signifikanz der behandlungsabhängigen Aktivitätsveränderungen

Die Prüfung des zweiten Problems (s.S. 14) ließ sich ebenfalls mit der doppelten Varianzanalyse durchführen. Bei dem sonst gleichen Berechnungsschema ändertensich lediglich zwei der angewandten Symbole: i = Hauptgruppen (Behandlungen); k = Untergruppen (Zeiten) (Ergebnisse s.S.34).

Ad.3. Ermittlung der Unterschiede der Einbaugeschwindigkeiten bei verschiedener Vorbehandlung der Erythrozyten

Nachdem wir durch ad 2) feststellen konnten, daß beim Vergleich der verschiedenen Behandlungen die Aktivität statistisch signifikant ansteigt, sollte nun die Geschwindigkeit des Einbaus der Isotope innerhalb einer jeden Behandlung ermittelt werden. Dies erfolgte mit Hilfe der Korrelations- und Regressionsanalyse:

Hiermit kann festgestellt werden, ob zwischen zwei stetigen Zufallsvariablen x und y eine Abhängigkeit besteht. Als zu unterscheidende Größen lagen hier als Wert x = Zeit der Inkubation, und als Wert y = Meßwert der spezifischen Aktivität der Erythrozyten in Prozent vor. Bei der Übertragung der Meßergebnisse der In-vitro- und In-vivo-Versuche in ein Koordinatensystem konnte bereits aus der Verteilung der Punkte festgestellt werden, daß zwischen x und y kein linearer Zusammenhang besteht. Der Versuch, einen linearen Zusammenhang herzustellen, gelang lediglich für die In-vitro-Versuche. Linearität wurde durch eine Transformation erreicht, bei der der Logarithmus der Zeit zu der dritten Wurzel der Radioaktivität aufgetragen ist (Abb.16,17). Bei gleicher Transformation ergab sich für die In-vivo-Versuche eine recht große Streuung (Abb.30), so daß wir die Halbwertszeit der Elimination und die Geschwindigkeitskonstante $k = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$ durch die Methode der Zerlegung komplexer Exponentialfunktionen ermittelten (Abb.29).

Ein rechnerisches Maß für einen linearen Zusammenhang stellt der BRAVAIS-PEARSON'sche Korrelationskoeffizient dar (Freudenberg (30), Koller (51)). Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\text{Korrelationskoeffizient } r = \frac{s_{xy}}{\sqrt{s_{xx} \cdot s_{yy}}}$$

$$s_{xy} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})(x_i - \bar{x}) = \sum_{i=1}^n x_i \cdot y_i - \frac{\sum_{i=1}^n x_i \cdot \sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

$$s_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}$$

$$s_{yy} \text{ analog } s_{xx}$$

$$n = \text{Zahl der Versuche}$$

Ist der absolute Wert von $r=1$, dann liegt vollständige lineare Abhängigkeit vor, wie bei einer mathematischen Funktion; beträgt dagegen $r=0$, so besteht kein, bzw. kein

linearer Zusammenhang. Umgekehrt kann aus $r=0$ nicht zwingend auf das Fehlen eines Zusammenhangs geschlossen werden.

Um zu einer rechnerischen Beziehung und einer Möglichkeit der Aussage zu gelangen, wurde die Regressionsgerade berechnet. Die Berechnung erfolgte mit der Methode der kleinsten Quadrate, bei der die Summe der Abweichungsquadrate zwischen den einzelnen Meßwerten und den entsprechenden Werten auf der Geraden ein Minimum wird. Die Formel für die Regressionsgerade lautet:

$$y_R = bx + a$$

$$\text{Regressionskoeffizient } b = \frac{s_{xy}}{s_{xx}}$$

$$\text{Regressionskonstante } a = \bar{y} - b\bar{x}$$

(Schnittpunkt der Regr.-Geraden mit der Ordinate).

Mit Hilfe der Regressionsgleichung kann für jeden in Frage kommenden x -Wert der dazugehörige durchschnittliche y -Wert errechnet werden.

$$\begin{aligned} \text{Beispiel: } y_R &= bx + a; & b &= 2,92 \\ & & x &= 4 \\ & & a &= 0,995 \end{aligned}$$

$$y_R = 2,92 \cdot 4 + 0,995 = 12,7$$

Es wird sich bei einer Zeit von 4 Minuten eine spezifische Erythrozytenaktivität von 12,7 % Inkubationsausbeute ergeben.

Da der Regressionskoeffizient b angibt, um wieviel y im Durchschnitt zunimmt, wenn x um eine Einheit wächst, ist durch b die Steigung der Regressionsgeraden, die der Einbaugeschwindigkeit des Isotops entspricht, gegeben. Durch einen Vergleich der Steigungen der Geraden der verschiedenen Versuche ist eine Aussage über den Unterschied der Einbaugeschwindigkeit zwischen verschiedenen Behandlungen (Waschen, Träger usw.) möglich (Ergebnisse s.S. 36).

Ad.4. Signifikanz der Unterschiede der Linbaugeschwindigkeiten

Ob nun dieser Unterschied der Linbaugeschwindigkeiten statistisch signifikant ist, wird mit Hilfe einer Kovarianzanalyse geprüft. Das Prinzip dieser schon komplizierteren statistischen Methode kann hier nicht eingehend geschildert werden. Es sei auf Darstellungen statistischer Lehr- und Handbücher (51,52,83) verwiesen (Ergebnisse s.S. 72, 73).

Ad.5. Signifikanz der Änderung der Erythrozytenelimination

Die Methode der doppelten Varianzanalyse mit Wiederholungen wurde zur Beantwortung der 5. Frage (s.S. 14) herangezogen.

Beispiel:

Relative spezifische Erythrozytenaktivität
 $([^{203}\text{Hg}(\text{CN})_2])$ bei drei Kaninchen, bei Vortbehandlung
 mit unterschiedlichen Mengen an Trägersubstanz
 $(\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2)$ und bei verschiedenen Zeiten.

Tab.4. Schema der doppelten Varianzanalyse mit Wiederholungen für das angegebene Beispiel.

Zeit (Min.)	Anzahl Tiere	ohne Träger	0,33mg/ml E. Träger	0,50mg/ml E. Träger
15	3	54,29	30,51	18,82
		56,75	26,74	17,05
		55,25	28,15	20,80
30	3	51,36	20,69	11,90
		50,39	19,11	10,75
		45,19	19,87	13,26
60	3	42,38	16,09	6,72
		40,99	14,30	7,63
		38,49	17,10	7,95
120	3	31,30	10,50	4,57
		25,49	11,86	5,72
		30,33	13,22	4,79
240	3	20,91	5,87	4,08
		15,82	5,23	4,37
		10,41	6,35	3,84
360	3	11,75	4,62	3,90
		11,48	4,89	3,71
		11,15	5,12	2,67

Zwischen den 18 Klassen bzw. Zellergebnissen ergeben sich 17 Freiheitsgrade. Zwischen den 3 Werten in jeder Zelle hat man je 2 Freiheitsgrade, im ganzen innerhalb jeder Gruppe 8 und zwischen allen 54 Werten sind es 53 Freiheitsgrade.

Die Fragen, die wir im Zusammenhang mit den Zahlen des Beispiels stellten, lauteten wie folgt: Bestehen Unterschiede zwischen den 3 Behandlungen (unterschiedliche Trägersmengen) und zwischen den 6 Zeiten? Ist der Unterschied in der Wirkung der Behandlung derselbe für alle 6 Zeiten? Bestehen Unterschiede zwischen den Wiederholungen von Tier zu Tier?

Wie aus Tab.4 zu ersehen, unterscheidet sich das Grundschema von Tab.1 lediglich durch eine zusätzliche Unterteilung der Untergruppe in Zellen. Analog dem Beispiel der doppelten Varianzanalyse wurden folgende Größen berechnet:

$$\text{Gesamtsumme} = x = 1027,76 \quad (1)$$

$$\text{Korrekturglied} = K = \frac{x^2}{n} = 19560,937 \quad (2)$$

$$\text{Summe der Quadrate insges.} = \sum x^2 = 32379,405 \quad (3)$$

$$\text{Summe der Quadrate der Zellenmittelwerte} =$$

$$\sum \frac{U^2}{3} = 32037,569 \quad (4)$$

$$\text{Summe der Quadrate zwischen den Zeilen} =$$

$$\sum \frac{A^2}{6} = 24567,952 \quad (5)$$

$$\text{Summe der Quadrate zwischen den Spalten} =$$

$$\sum \frac{B^2}{18} = 26097,471 \quad (6)$$

$$\text{Streuung zwischen den Zeiten} = \text{SAQ}_A = (5)-(2) = 5007,072$$

$$\text{Streuung zwischen den Behandlungen (Trägern)} = \text{SAQ}_B = (6)-(2) = 6536,534$$

$$\text{Streuung zwischen den Wiederholungen (Versuchsfehler)} = (3)-(4) = 342,246 = (7)$$

$$\text{Wechselwirkung AB} = \text{Streuung insges.} - \text{SAQ}_A + \text{SAQ}_B + (7) = 942,623$$

$$\text{Streuung insges.} = (3) - (2) = 12818,475$$

Die Wechselwirkung mißt den Unterschied der Abweichungen der Einzelwerte vom Zeilendurchschnitt gegenüber den Abweichungen des entsprechenden Spaltendurchschnitts vom Gesamtdurchschnitt, Linder (52).

Wenn in vorliegendem Beispiel die Trägersubstanz-Zugabe für die Werte der spezifischen Erythrocytenaktivität zu den verschiedenen Zeiten in gleicher Weise wirksam ist, wird der 'Unterschied' klein sein. Wenn die Wirkung dagegen von einer Zeit zur anderen wechselt, wird die Summe der Quadrate jenes Unterschiedes groß ausfallen. Es ist daher berechtigt, von einer Wechselwirkung zwischen Trägersubstanz und Eliminationszeit zu sprechen. Man pflegt dies symbolisch als Wechselwirkung AB zu bezeichnen. Der Freiheitsgrad der Wechselwirkung ist gleich dem Produkt der Freiheitsgrade der beiden beteiligten Gruppen.

Für das Beispiel können wir die ganze doppelte Varianzanalyse mit Wiederholungen zusammenfassend wie folgt darstellen (Tab.5):

Tab.5. Ergebnisse der doppelten Varianzanalyse mit Wiederholungen für das berechnete Beispiel.

Art der Streuung	Summe der Abw.-Quadrate (SAQ)	Freih. Grade	Durchschnitt der Abw.-Quadrate (MAQ)
zwischen A (Zeiten)	5007,072	5	1001,414
zwischen B (Träger)	6536,534	2	3268,267
Wechselw. AB	942,623	10	94,262
Versuchsfehler	342,246	36	9,507
Streuung insg.	12818,475	53	

In erster Linie ist zu prüfen, ob die Wechselwirkung gesichert ist: $F = \frac{94,262}{9,507} = 9,915$; daraus folgt: $P < 1 \%$.

Somit ist die Annahme, es bestehe keine Wechselwirkung, widerlegt. Den Einfluß der Trägermenge prüfen wir mittels $F = \frac{1001,414}{9,507} = 105,334$ welcher Wert bei $n_1 = 2$, $n_2 = 46$ mit $F_{0,01} = 3,20$ zu vergleichen ist. Wenn die Trägermenge ohne jeden Einfluß wäre, müßte das Verhältnis F der Verteilung von F mit $n_1 = 2$ und $n_2 = 46$ folgen. Da der berechnete Wert $F = 105,334$ den Wert $F_{0,01} = 3,20$ weit überschreitet, ist die Annahme widerlegt, daß zwischen den verschiedenen Behandlungen (Trägermengen) kein Unterschied besteht.

Über die Wirkung der Zeiten (Inkubationsdauer) gibt die Berechnung $F = \frac{3268,267}{9,507}$ und der Vergleich mit $F_{0,01}$ für $n_1 = 5$ und $n_2 = 46$ Aufschluß. Auch hier ergeben sich wesentliche Unterschiede. Der Versuchsfehler ist mit 9,507 gering gehalten.

Ad.6. Über die Signifikanz der Unterschiede der relativen spezifischen Organaktivitäten siehe S. 56.

Für alle Tierversuche wurden außerdem errechnet: Durchschnittswerte = $\bar{x}$.

Standardabweichung des Mittelwertes = $s_{\bar{x}}$

Folgende Formeln lagen der Berechnung zugrunde:

Durchschnittswert der Einzelwerte = $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$

Standardabweichung des Mittelwertes = $s_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{n}}$

Die doppelte Standardabweichung des Mittelwertes = $2 s_{\bar{x}}$ wurde jeweils in die Abbildungen übernommen.

III. Ergebnisse

III.1

In-vitro-Versuche

III.1.1

Inkubation und Elution mit ^{203}Hg und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der Erythrozyten (Plasmasuspension)

Bei Durchführung der Versuche ergaben sich die in Abbildung 4 und 5 dargestellten Inkubations- und Elutionsverläufe.

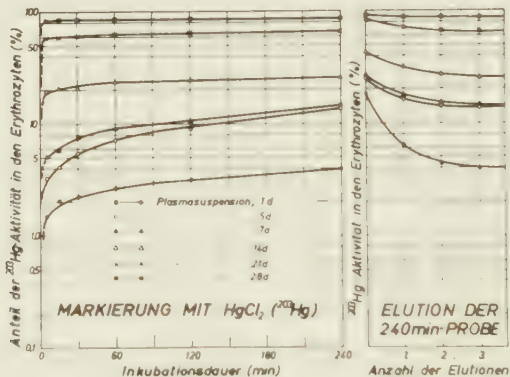


Abb.4. Inkubation und Elution mit $^{203}\text{HgCl}_2$ in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der Erythrozyten (Plasmasuspension).

Aus Abb.4 und 5 kann folgendes ersehen werden bzw. durch Einsetzen der Werte in die Formeln der beschriebenen statistischen Methoden errechnet werden:

1. Innerhalb eines Parameters (z.B. Plasmasuspension 1d) nimmt die Beladung mit dem verwendeten Isotop mit steigender Inkubationszeit zu.

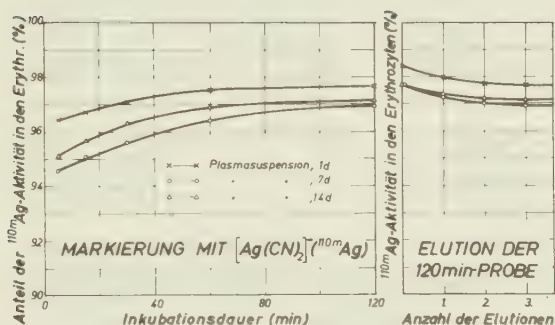


Abb.5. Inkubation und Elution mit $[^{110m}Ag(CN)_2]^-$ in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der Erythrozyten (Plasmasuspension).

Mittels doppelter Varianzanalyse ergab sich für ^{203}Hg (P.S. 1d) eine Varianz zwischen den Zeiten von $F_1 = 14$; $P < 1 \%$, während ein Unterschied zwischen den Wiederholungen nicht nachweisbar ist ($P > 5 \%$). Gleiches gilt bei Verwendung von ^{110m}Ag ($F_1 = 13,34$; $P < 1 \%$ und $F_2 = 0,67$; $P > 5 \%$).

Diese zeitabhängige Aktivitätszunahme konnte bei den Lagerungsversuchen mit ^{203}Hg für die Lagerungszeiten 1d, 5d und 7d und 14d bestätigt werden. Bei 21d Lagerung hingegen zeigte sich lediglich eine statistische Auffälligkeit bezüglich der Aktivitätszunahme (P zwischen den Zeiten $< 5 \%$; zwischen den Wiederholungen $> 5 \%$), während beim 28d-Versuch keine Abhängigkeit zwischen Inkubationszeit und Inkubationsausbeute mehr zu erkennen ist (P zwischen den Zeiten $> 5 \%$).

Für ^{110m}Ag ergab sich bei Lagerung von 7d (14d) statistisch Signifikanz (Auffälligkeit).

2. Die Zunahme der Inkorporation mit ^{203}Hg mit steigender Lagerungszeit (Vergleich der Parameter 1d, 5d, 7d usw. untereinander) ist offensichtlich (Abb. 4, 5) und mit einem F-Wert von 198,6 ($P < 1\%$) hoch gesichert. Demgegenüber ergibt sich für $^{110\text{m}}\text{Ag}$ lediglich eine statistische Auffälligkeit.

3. Durch Markierung mit $^{110\text{m}}\text{Ag}$ kann schon bei 1 Tag alten Erythrozyten etwa die gleiche Inkubationsausbeute erhalten werden wie bei Markierung mit ^{203}Hg von 4 Wochen alten Zellen.

4. Der kinetische Ablauf der Isotopenaufnahme unterscheidet sich zwar grundsätzlich, die hohe Affinität der Erythrozyten zu den Nukliden - ersichtlich aus dem Elutionsverlauf - ist aber beidemale in gleicher Weise vorhanden.

III.1.2

Inkubation und Elution mit ^{203}Hg und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ in Abhängigkeit von der Temperatur

Wie schon aus der Abb.6 zu vermuten, scheint bei Verwendung von $^{110\text{m}}\text{Ag}$ die Inkubation in Plasmasuspension von der Temperatur unabhängig zu sein.

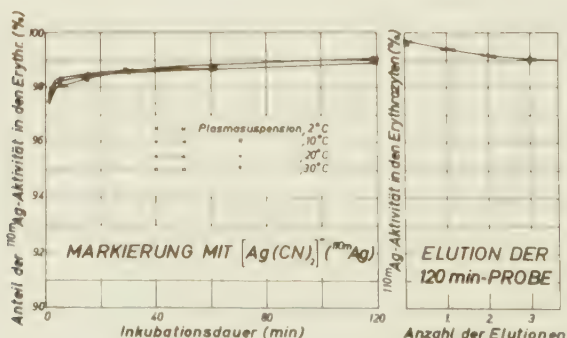


Abb.6. Inkubation und Elution mit $^{110\text{m}}\text{Ag}$ in Abhängigkeit von der Temperatur (Plasmasuspension).

Durch Anwendung der doppelten Varianzanalyse wurde ermittelt, daß für ^{110m}Ag sowohl die zeitabhängige Aktivitätszunahme bei einer Behandlung (Temperatur), als auch innerhalb der verschiedenen Behandlungen (2°C zu 10°C zu 20°C usw.) statistisch nicht gesichert ist. Der Einbau scheint somit schlagartig einen Wert zu erreichen, der dem maximalen Wert entspricht und durch unterschiedliche Temperaturen nicht zu beeinflussen ist.

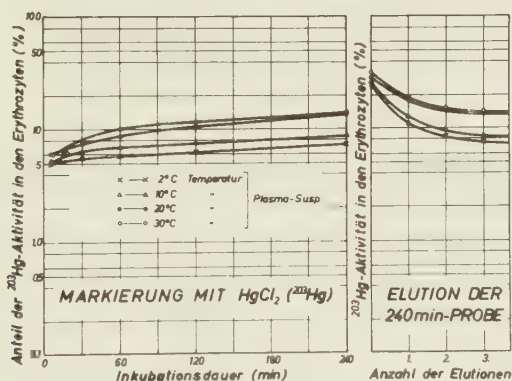


Abb.7. Inkubation und Elution mit ^{203}Hg in Abhängigkeit von der Temperatur (Plasmasuspension).

Dagegen konnte bei Verwendung von ^{203}Hg in Plasmasuspension eine Signifikanz des zeitabhängigen Anstiegs der Aktivität innerhalb einer Behandlung und eine statistische Auffälligkeit zwischen den Behandlungen festgestellt werden (Abb.7). Bei Inkubation in NaCl -Suspension ergab sich zudem eine Signifikanz zwischen den Behandlungen (Abb.8).

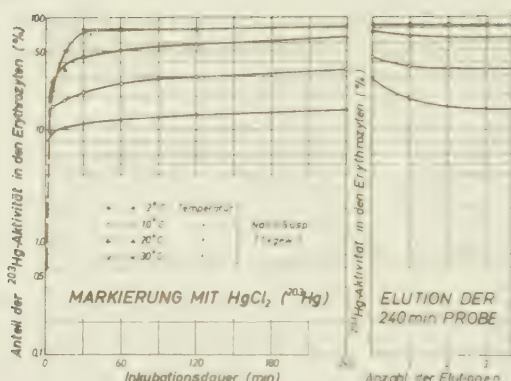


Abb.8. Inkubation und Elution mit ²⁰³Hg in Abhängigkeit von der Temperatur (NaCl-Suspension).

III.1.3

Einfluß einer Vorbehandlung mit isotonischer NaCl-Lösung (Waschen) auf Inkubations- und Elutionsverlauf

Werden Erythrozyten vor der Inkubation mehrfach mit isotonischer NaCl-Lösung ausgewaschen, so können bei der Markierung mit ²⁰³Hg mit der Zahl der Waschungen ansteigende Inkubationsausbeuten beobachtet werden (Abb.9). Die Erhöhung der Ausbeute bei fünfmaligem Waschen mit aliquoten Volumina von isotonischer NaCl-Lösung betrug im Vergleich zur Inkubation in Vollblut mehr als eine Größenordnung (von ca. 3-5 % auf über 80 %). Nach Mund-schenk (58) ist diese Zunahme der Ausbeute mit der Zahl der Elutionen reversibel: Werden mehrfach gewaschene Ery-throzyten in Plasma resuspendiert und anschließend inku-biert, so beobachtet man wieder die in diesem Medium zu erwartenden Ausbeuten von ca. 5 %.

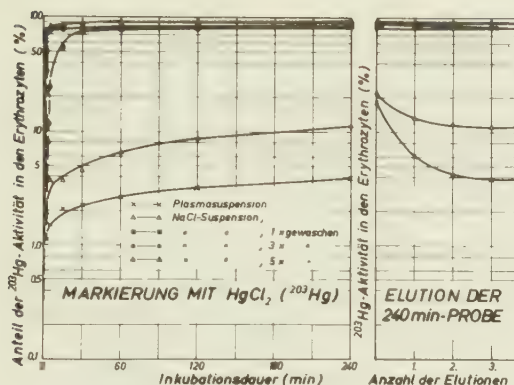


Abb.9. Inkubation und Elution mit ²⁰³Hg bei Vorbehandlung mit isotonischer NaCl-Lösung (Waschen).

Im einzelnen ergaben sich aus diesen Versuchen folgende Gesichtspunkte:

1. Markierung mit ²⁰³Hg:

Für die Versuche NaCl-Suspension, 1 x gewaschen und 3 x gewaschen (Abb.9), läßt sich statistisch eine Signifikanz des zeitabhängigen Aktivitätsanstieges nachweisen. Wurden die Erythrozyten 5 x gewaschen, so war kein Anstieg der Aktivität mit steigender Inkubationszeit zu registrieren (statistisch unauffällig).

2. Markierung mit ^{110m}Ag

Hier wurden schon nach 5 Minuten Inkubationszeit maximale Ausbeuten erreicht. Der Anstieg der Aktivität mit Zunahme der Inkubationszeit war statistisch unauffällig, während sich der Unterschied zwischen Plasmassuspension und 3 x gewaschen als signifikant erwies.

Bei der mit ²⁰³Hg durchgeführten Inkubation wurden nicht annähernd die Ausbeuten erzielt, die bei den mit ^{110m}Ag markierten Versuchen stets erreicht wurden.

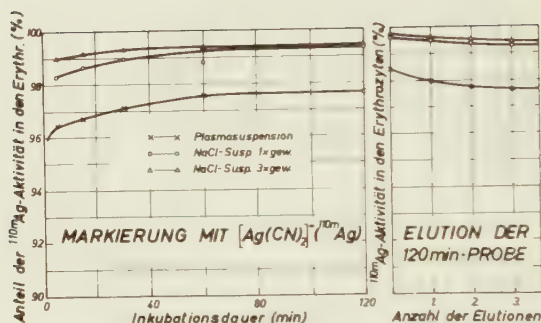


Abb.10. Inkubation und Elution mit $^{110\text{m}}\text{Ag}$ bei Vorbehandlung mit isotonischer NaCl-Lösung (Waschen).

Elutionsversuche an der 120 Min.-Probe ließen auf eine feste Bindung der aufgenommenen $^{110\text{m}}\text{Ag}$ -Anteile schließen; demgegenüber war die Elutionsrate bei ^{203}Hg deutlich erhöht.

III.1.4

Einfluß eines Zusatzes von $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bzw. $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ als Trägersubstanz auf Inkubations- und Elutionsverlauf mit und ohne Vorbehandlung mit isotonischer NaCl-Lösung

Wurden Trägersubstanzen in den angegebenen Konzentrationen (Abb.11,12) zu den Erythrozyten zugesetzt und anschließend markiert, so stieg sowohl bei Inkubation in Plasma- (Abb.11) als auch in NaCl-Suspension (Abb.12) die ^{203}Hg -Inkorporationsausbeute - insbesondere für kleine Zeitwerte - im Vergleich zur trägerfreien Inkubation um ein Vielfaches an.

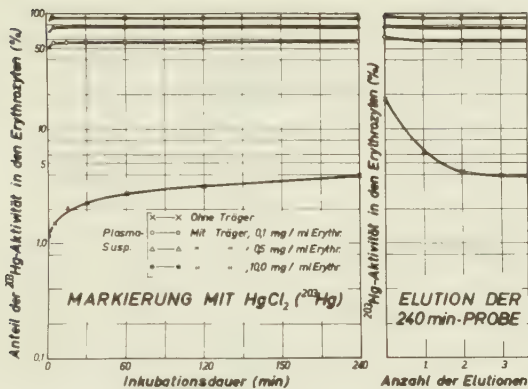


Abb.11. Einfluß eines Zusatzes von $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ in verschiedener Konzentration (0,1; 0,5; 10 mg/ml Erythrozyten) bei Inkubation in Plasmasuspension.

Zum anderen läuft der Markierungsvorgang offenbar viel schneller ab und ist bereits nach kurzer Zeit (< 5 Min.) abgeschlossen; eine Annahme, die durch Anwendung der doppelten Varianzanalyse - es ergab sich $P > 5\%$ - bestätigt wurde.

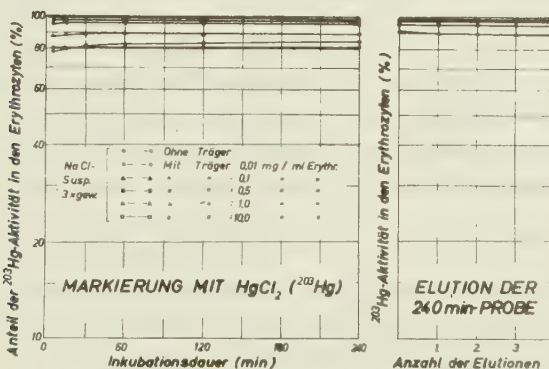


Abb.12. Einfluß eines Zusatzes von $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ in verschiedener Konzentration (0,01; 0,1; 0,5; 1,0 und 10,0 mg/ml Erythrozyten) bei Inkubation in NaCl-Suspension (3 x gewaschen).

Da das Waschen die Inkubationsausbeute steigert, ist der Trägereffekt bei Vorbehandlung mit isotonischer NaCl-Lösung quantitativ geringer bzw. bei Markierung mit ^{110m}Ag statistisch nicht gesichert (Abb.13).

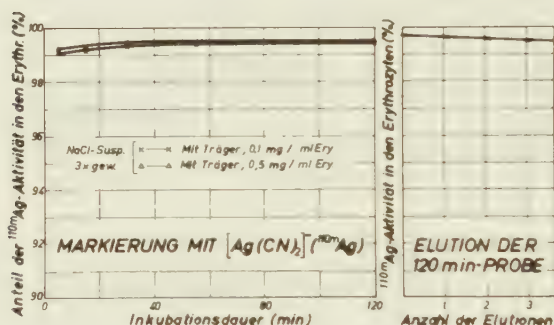


Abb.13. Einfluß eines Zusatzes von $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ in verschiedener Menge (0,1 und 0,5 mg/ml Erythrozyten) bei Inkubation in NaCl-Suspension (3 x gewaschen).

III.1.5

Markierung mit ^{110m}Ag bei $\text{Ag}(\text{NH}_3)\text{Cl}$ als Trägerzusatz mit und ohne KJ-Zusatz

Mit $\text{Ag}(\text{NH}_3)_3\text{Cl}$ als Trägersubstanz wird die Inkorporationsausbeute für Plasma- und NaCl-Suspension im Vergleich zu den Versuchen, bei denen $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ als Träger verwendet wurde (Abb.13), um ca. 30 % erniedrigt (Abb.14).

KJ-Zusatz steigerte zwar die Inkubationsausbeute, vermochte aber nach 120 Min. Inkubation nur ca. 60 % der Ausbeute zu erzielen, die bei einfacher Plasmasuspension ohne Trägerzusatz beobachtet wurde (siehe Abb.10). Selbst eine Inkubation in NaCl-Suspension ergab ähnlich niedrige Werte.

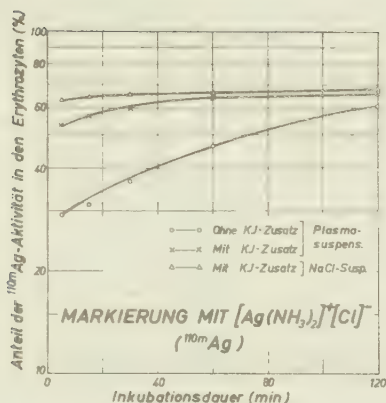


Abb. 14. Markierung mit ^{110m}Ag , bei $Ag(NH_3)Cl$ als Trägerzusatz, mit und ohne KJ-Zusatz in Plasma- und NaCl-Suspension.

III.1.6 Inkorporation von ^{203}Hg und ^{110m}Ag bei Leukozyten

Innerhalb des Fragenkomplexes zum Initialabfall (s.S. 41) wurde Vollblut mit beiden Isotopen inkubiert und nach der vorangehend beschriebenen Methode (s.S. 5) Leukozyten- und Erythrozytenfraktionen gewonnen. Bei der Ermittlung der spezifischen Aktivitäten zeigte es sich, daß der Einbau von ^{203}Hg in Erythrozyten um den Faktor 14 gegenüber Leukozyten erniedrigt ist, aber ^{110m}Ag eine ca. 20 mal geringere Affinität zu den Leukozyten als zu den Erythrozyten hat (Abb. 15).

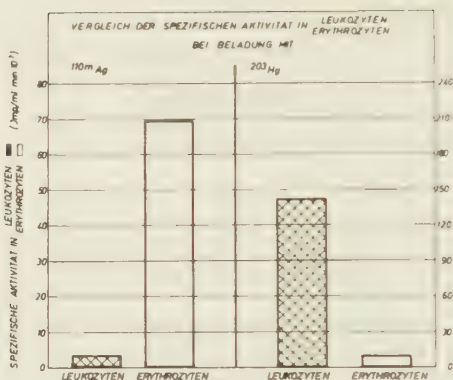


Abb.15. Vergleich der spezifischen Aktivitäten in Leukozyten und Erythrozyten bei Beladung mit ²⁰³Hg und ^{110m}Ag.

Statistische Ergebnisse der In-vitro-Versuche

1. Die durch doppelte Varianzanalyse erhaltenen Ergebnisse der zeitabhängigen Aktivitätszunahme innerhalb einer Behandlung sowie

2. die Resultate der behandlungsabhängigen Aktivitätszunahme (innerhalb einer Behandlungsgruppe, z.B. 1x, 3x, 5x-Waschen bzw. 0,1; 0,5; 1,0 Träger) wurden bereits im Text erwähnt.

3. Im folgenden sind die Unterschiede einzelner Behandlungen der verschiedenen Behandlungsgruppen aufgeführt:

^{110m}Ag:

Es wurde der Zusammenhang für folgende Behandlungen geprüft: Plasma- und NaCl-Suspension, 3 x gewaschen, Alter 14d. Die Werte sind aus Tabelle 6 zu ersehen.

Tab.6. Doppelte Varianzanalyse einzelner Behandlungen
(Plasma- und NaCl-Suspension, 3 x gewaschen, Alter
14 d) bei Markierung mit ^{110}mAg .

$\sum_{ij} x_{ij} = x = 92,003$	$\frac{x^2}{n(1)} = 423,2276$	$\sum_{ij} x_{ij(2)}^2 = 424,2571$
$n = 20$	$\frac{\sum_i x_i^2 \cdot j}{k(3)} = 424,2464$	$\frac{\sum_i x_i^2}{l(4)} = 423,2341$

Varianz	SAQ	f	MAQ = $\frac{\text{SAQ}}{f}$	F
zwischen den Spalten $a = (3)-(1)$	1,0188	$\frac{(1-1)}{3}$	0,3396	970,2857 $\frac{\text{MAQ}(a)}{\text{MAQ}(c)}$
Zwischen den Zeilen $b = (4)-(1)$	0,0065	$\frac{(k-1)}{4}$	0,001625	4,6428 $\frac{\text{MAQ}(b)}{\text{MAQ}(c)}$
Restvarianz $c = (d)-(a)-(b)$	0,0042	$\frac{(k-1) \times (l-1)}{12}$	0,00035	
Gesamtvarianz $d = (2)-(1)$	1,0295	$\frac{(n-1)}{19}$	$k = \text{Anzahl der Zeilen}$ $l = \text{Anzahl der Spalten}$	

Der Unterschied zwischen den Spalten (Behandlungen) wurde somit ($P < 1\%$) statistisch gesichert, während zwischen den Zeilen (Zeiten bei verschiedenen Behandlungen) statistisch keine Auffälligkeit bestand ($P > 5\%$).

Für ^{203}Hg ergab die Berechnung, daß die Unterschiede sowohl zwischen den Behandlungen (Plasma- und NaCl-Suspension, 3 x gewaschen, Temperatur 30°C , Alter 28d, Träger 10 mg/ml Erythrozyten), als auch zwischen den Zeiten bei verschiedenen Behandlungen signifikant waren.

4. Die Auswertung der Korrelations- und Regressionsanalysen ergab folgende Resultate:

Zusammenhang zw. x und y	Korrel.-Koeffiz.	Regressionsgerade
Plasmasuspens.	0,9968	$y_R = 0,2329x + 0,9718$ $x_R = 4,3287y - 4,2194$
NaCl-Suspension	0,9291	$y_R = 0,4257x + 1,1378$ $x_R = 2,0335y - 2,0986$
3x gewaschen	0,9638	$y_R = 0,0738x + 4,2191$ $x_R = 12,5909x - 53,1084$
5x gewaschen	0,9740	$y_R = 0,1021x + 4,3176$ $x_R = 9,2961y - 40,0556$
Alter 21d	0,9369	$y_R = 0,0942x + 3,8205$ $x_R = 9,3052x - 35,3526$
Temperatur 30°C	0,9853	$y_R = 0,3790x + 1,4487$ $x_R = 0,8692y - 0,2049$
Träger 0,5 mg	0,9875	$y_R = 0,0261x + 3,7971$ $x_R = 5,2127y - 18,4142$
Träger 1,0 mg	0,9426	$y_R = 0,0196x + 4,2255$ $x_R = 25,379y - 106,436$

Tab.7. Ergebnisse der Korrelation zwischen einzelnen Behandlungen bei Verwendung von ^{203}Hg zur Markierung der Erythrozyten. Die Unterschiede sind in allen Versuchen hoch gesichert.
Zur Berechnung wurden die gemessenen Ausgangswerte (Zeit; Radioaktivität) transformiert (Logarithmus Zeit = x; dritte Wurzel Radioaktivität = y) (s.S.18).

Tab.8. Ergebnisse der Korrelation zwischen einzelnen Behandlungen bei Verwendung von ^{110m}Ag zur Markierung der Erythrozyten. Die Unterschiede sind in allen Versuchen gesichert.

Zur Berechnung wurden die gemessenen Ausgangswerte (Zeit; Radioaktivität) transformiert (Logarithmus Zeit = x; dritte Wurzel Radioaktivität = y) (s.S. 18).

Zusammenhang zw. x und y	Korrel.-Koeffiz.	Regressionsgerade
Plasmasuspension	0,9817	$y_R = 0,01837x + 4,5691$ $x_R = 52,5y - 74,2218$
NaCl-Suspension	0,9724	$y_R = 0,0157x + 4,5886$ $x_R = 60,09y - 275,2308$
1x gewaschen	0,9987	$y_R = 0,01049x + 4,6089$ $x_R = 120,0y - 553,4388$
3x gewaschen	0,9978	$y_R = 0,00516x + 4,6238$ $x_R = 59,0y - 271,7996$
Alter 14d	0,9920	$y_R = 0,0262x + 4,5470$ $x_R = 37,5y - 170,5098$

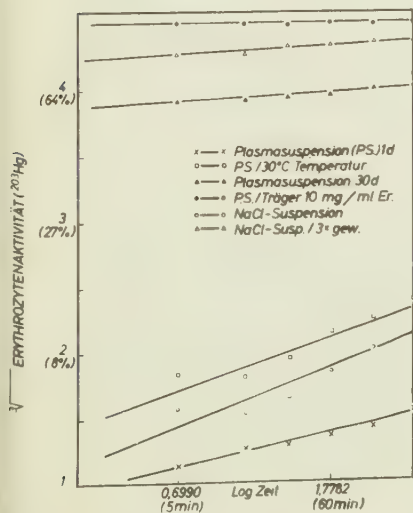


Abb.16.

Beziehung zwischen Zeit und Aktivität (^{203}Hg) für einzelne Behandlungen. Die nicht transformierten Werte der Koordinaten sind in Klammern gesetzt.

Es besteht sehr gute Korrelation.

Die Darstellung einzelner, in den Tabellen 7 und 8 angegebener Regressionsgeraden ist in den Abbildungen 16 und 17 vorgenommen.

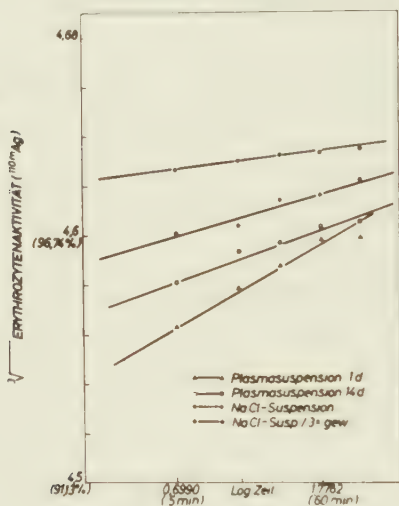


Abb.17. Beziehung zwischen Zeit und Aktivität (^{110m}Ag) für einzelne Behandlungen. Die nicht transformierten Werte der Koordinaten sind in Klammern vermerkt. Es besteht sehr gute Korrelation.

5. Ergebnisse der Kovarianzanalyse

Die Prüfung der durch Korrelations- und Regressionsanalyse befundenen Unterschiede der Einbaugeschwindigkeiten der Isotope (unterschiedliche Steigung der Regressionsgeraden) auf deren statistische Signifikanz erfolgte mit Hilfe einer sog. Kovarianzanalyse. Bei der Berechnung - die Methode ist in ihren Details bei Koller (51) nachzulesen - konnten einzelne Größen aus den Regressionsrechnungen übernommen werden:

$$s_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}; \quad s_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

$$s_{xy} = \sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}$$

Somit ließ sich d^2 leicht errechnen: $d^2 = s_{yy} - \frac{(s_{xy})^2}{s_{xx}}$

Die Durchführung der Kovarianzanalyse ergab, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 1 %, daß die Unterschiede der Einbaugeschwindigkeiten für beide Isotope gesichert sind (^{203}Hg : $F(8,36) = 17,006$ daraus folgt $P < 1 \%$).

Es ist somit die Hypothese, die Einbaugeschwindigkeiten seien bei den verschiedenen Behandlungen gleich, abzulehnen.

III.2.

Ergebnisse der In-vivo-Versuche

III.2.1

Zeitabhängige Elimination von mit ^{203}Hg bzw. ^{110m}Ag markierten und alterierten Erythrozyten aus der Blutbahn

Die vorliegenden Ergebnisse der In-vitro-Versuche ließen eine hohe Affinität der Zellbestandteile zu den angewendeten Isotopen erkennen. Aus diesem Grunde erschien eine Anwendung zur Erythrozytenlebenszeitbestimmung interessant. Die Durchführung dieses Versuchs ergab die in den Abbildungen 18 und 19 dargestellten Verläufe der relativen spezifischen Erythrozytenaktivitäten:

Aus beiden Abbildungen geht eindeutig hervor, daß der Verlauf der spez. ^{110m}Ag - und der spez. ^{203}Hg -Erythrozytenaktivität keinesfalls der normalen - mit ^{51}Cr -Markierung ermittelten - Absterbefrequenz der Zellen entspricht. Vielmehr war schon in den ersten Stunden ein steiler Initialabfall der Aktivität im Blut zu verzeichnen.

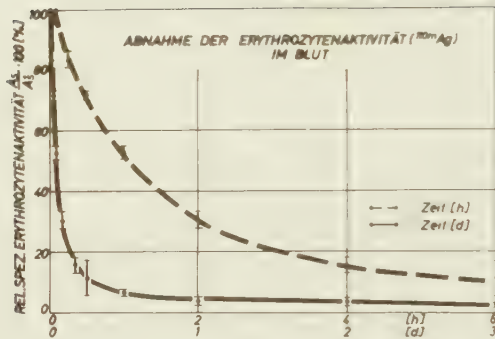


Abb.18. Abnahme der Erythrozytenaktivität (^{110m}Ag) im Blut in Abhängigkeit von der Zeit nach Injektion der markierten Zellen *).

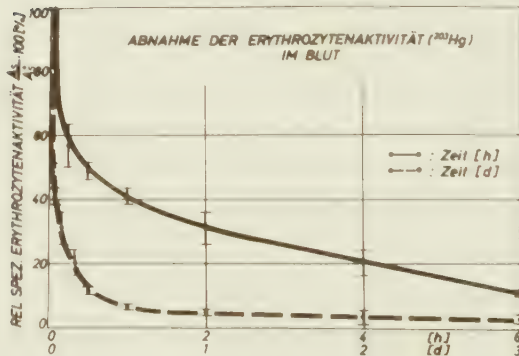


Abb.19. Abnahme der Erythrozytenaktivität (^{203}Hg) im Blut in Abhängigkeit von der Zeit nach Injektion der markierten Zellen.

*) Als Maß für die Streuung wurden in dieser und den folgenden Abbildungen die $2s_x$ -Werte eingezeichnet.

Ein Vergleich der Kurven zeigt, daß die Abnahme der Aktivität bei Markierung mit ^{203}Hg in den ersten 30 Minuten zwar schneller erfolgt als bei Markierung mit $^{110\text{m}}\text{Ag}$ (Werte: 48 %; 72 %), der nach 3 Tagen erreichte Endwert aber in beiden Fällen nahezu gleich war (ca. 3 % der rel. spezifischen Erythrozytenaktivität für $t = 0$).

Dieser in den ersten Tagen zu beobachtende steile Abfall der Aktivität im Blut der Versuchstiere findet möglicherweise in folgenden Überlegungen eine Erklärung:

1. Die Beladung mit ^{110}Ag bzw. ^{203}Hg bewirkte eine chemische Alteration der Erythrozyten, die sodann als körperfremde Zellen aus der Blutbahn eliminiert wurden.

2. Die Verteilung der $^{110\text{m}}\text{Ag}$ - bzw. ^{203}Hg -Aktivität auf die verschiedenen Altersgruppen der gesamten Zellpopulation erfolgte sehr heterogen, so daß die pro Zeiteinheit aus der Blutbahn eliminierte Aktivität eine Funktion des Erythrozytenalters (bezogen auf den Injektionszeitpunkt) darstellt.

3. Die Bindung von $^{110\text{m}}\text{Ag}$ bzw. ^{203}Hg erfolgt an Bestandteile der Zelle, die eine weit höhere Turnover-Rate aufweisen als die Zelle selbst. Diese Annahme würde allerdings mit den Ergebnissen der In-vitro-Versuche, die eine hohe Bindungsfestigkeit ergaben, nicht in Einklang stehen (58).

Zur Klärung der sich hieraus ergebenden Fragen wurden weitere Versuche durchgeführt (Punkt 2.; 3.; 4.).

III.2.2

Simultanmarkierung mit $^{197}\text{Hg}/^{51}\text{Cr}$ bzw. $^{110\text{m}}\text{Ag}/^{51}\text{Cr}$

Bei Doppelmarkierung von Erythrozyten mit zwei Radionukliden ^{51}Cr und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ bzw. ^{51}Cr und ^{197}Hg ergaben sich in beiden Versuchen unterschiedliche Aktivitätsverläufe beider Nuklide. Wie die Abbildungen 20, 21 zeigen, fiel die rel. spez. Aktivität für ^{51}Cr deutlich langsamer ab als für die beiden anderen Isotope.

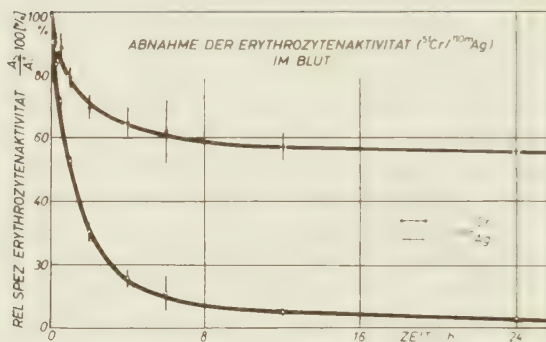


Abb. 20. Abnahme der Erythrozytenaktivität ($^{51}\text{Cr}/^{109m}\text{Ag}$) im Blut in Abhängigkeit von der Zeit nach Injektion der simultanmarkierten Zellen.

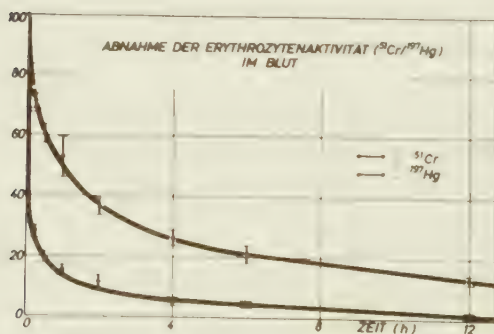


Abb. 21. Abnahme der Erythrozytenaktivität ($^{51}\text{Cr}/^{197}\text{Hg}$) im Blut in Abhängigkeit von der Zeit nach Injektion der simultanmarkierten Zellen.

III.2.3

Einfluß eines Zusatzes von $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bzw. $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ auf die Elimination der Erythrozyten aus der Blutbahn

Bei Beladung von mit ^{51}Cr bzw. $^{110\text{m}}\text{Ag}$, $^{197},^{203}\text{Hg}$ -markierten Erythrozyten mit inaktiven Trägersubstanzen ($\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bzw. $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$) trat mit steigender Trägermenge eine Alteration der Zellen ein, die zu deren Elimination aus der Blutbahn führte.

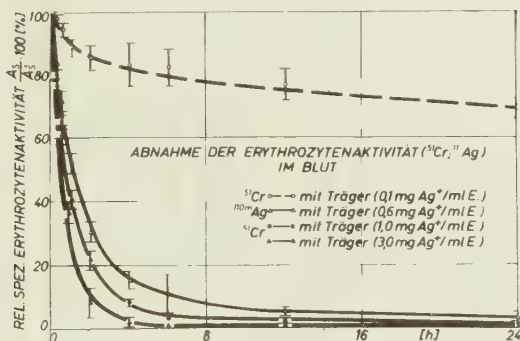


Abb.22. Abnahme der Erythrozytenaktivität (^{51}Cr bzw. $^{110\text{m}}\text{Ag}$) im Blut in Abhängigkeit von der Beladung mit verschiedenen Trägermengen $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$.

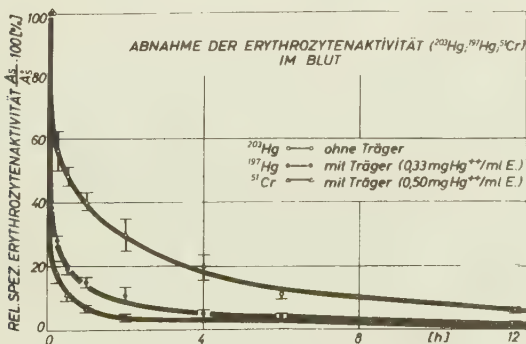


Abb.23. Abnahme der Erythrozytenaktivität (^{51}Cr ; ^{197}Hg ; ^{203}Hg) im Blut in Abhängigkeit von der Beladung mit verschiedenen Trägermengen $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

III.2.4

Markierungsversuche mit ^{59}Fe

Es wurde zunächst die Geschwindigkeit und Höhe der Fe-Utilisation für die Hämoglobinbildung im peripheren Blut durch Bestimmung der spez. Erythrozytenaktivität (^{59}Fe) ermittelt (Abb.24).

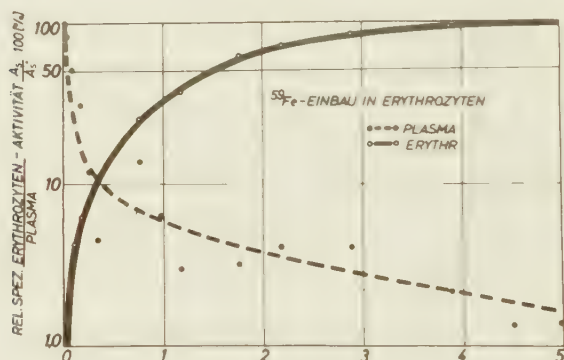


Abb.24. ^{59}Fe -Einbau in Erythrozyten — und die synchron verlaufende Abnahme der ^{59}Fe -Aktivität im Plasma --- in Abhängigkeit von der Zeit (Tage) nach i.v. Injektion der Aktivität.

Wie aus Abb.24 zu ersehen ist, war der Einbau der Aktivität innerhalb von 5 Tagen abgeschlossen, so daß die Erythrozyten nach dem Anreicherungsschema (Abb.3) aufgetrennt werden konnten. Als Ergebnis dieser Versuche konnten wir feststellen, daß die Radioaktivität (^{59}Fe) mit steigender Zentrifugationsgeschwindigkeit im oberen Drittel des Zentrifugenglases zunimmt, d.h. daß sich dort die jungen - maximal 6 Tage alten - Zellen anreichern (Abb.25).

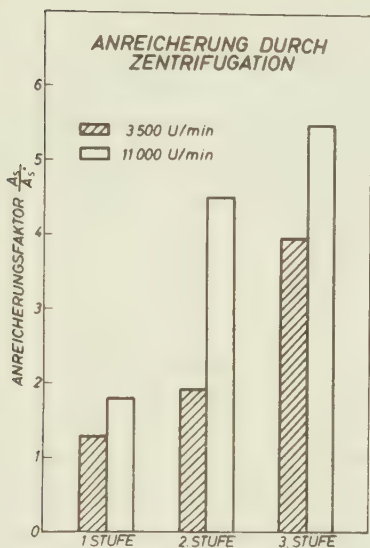


Abb.25. Anreicherung von maximal 6 Tage alten, mit ^{59}Fe -markierten Erythrozyten im oberen Bereich des Zentrifugenglases durch fraktionierte Zentrifugation bei unterschiedlicher Zentrifugationsgeschwindigkeit.

Zur Berechnung des Anreicherungs-faktors sei als Beispiel der Versuch bei 3500 Upm angegeben: Die Ausgangsaktivität betrug 19900 I/min,ml. In der I.-Stufe der Anreicherung wurden im oberen Drittel des Zentrifugenglases 27900, im unteren 12000 I/min,ml gezählt. Somit ergab sich im oberen Drittel ein Faktor von ca. 1,4 ($\frac{27900}{19900}$) in der I.-Stufe der Anreicherung. Auf gleiche Weise ermittelten wir die Faktoren der Stufen II und III mit 1,93 bzw. 3,97.

Unter Beibehaltung der angegebenen Versuchsbedingungen wurde die gleiche Fragestellung bei Beladung mit ^{203}Hg und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ geprüft. Hierbei ergaben sich folgende Gesichtspunkte:

1. Im Gegensatz zum ^{59}Fe -Versuch trat keine Anreicherung im oberen, sondern eine solche im unteren Drittel des Zentrifugenglases ein (Abreicherung).

2. Diese Abreicherung ist bei Markierung mit ^{203}Hg deutlicher als bei Verwendung von $^{110\text{m}}\text{Ag}$.

3. Die Abreicherungsfaktoren - ermittelt durch Zentrifugation bei 11000 U/min lagen bei ^{203}Hg ($^{110\text{m}}\text{Ag}$)-Markierung im Durchschnitt wie folgt:

Stufe I: 0,88; (0,83)

Stufe II: 0,71; (0,79)

Stufe III: 0,69; (0,75)

Entsprechend zeigte sich eine Anreicherung in den gealterten Erythrozyten (älter als 6 Tage) bei Messung der Stufe III um den Faktor 1,4 (^{203}Hg) und 1,3 ($^{110\text{m}}\text{Ag}$).

Zur Beantwortung der Frage, ob eine noch höhere Abreicherung zu erzielen sei, untersuchten wir in gleicher Weise 10 Tage lang mit $^{110\text{m}}\text{Ag}$ bei 4°C inkubiertes, arterielles Blut, welches nach Section des Versuchstieres durch Punktion der linken Kammer gewonnen wurde: Schon in Stufe I zeigte sich eine Abreicherung von durchschnittlich 0,60 (= über 150 %). Bei Verwendung venösen Blutes, das zuvor 10 Tage gelagert (4°C), aber frisch inkubiert wurde ($45\text{ min.}, 22^{\circ}\text{C}$), konnten wir einen Abreicherungsfaktor von 0,3 (über 300 %) in Stufe I ermitteln. Weitere Stufen mußten wegen eingetretener Hämolyse verworfen werden.

Innerhalb der Markierungsversuche mit ^{59}Fe und der Feststellung der Verteilung der Aktivität auf die verschiedenen Altersstufen der Erythrozytenpopulation untersuchten wir abschließend einige am Rande dieser Arbeit stehende Fragen:

1. Ist die Hämolyse gleichmäßig auf die verschiedenen Altersstufen verteilt oder liegt eine Hämolyse zu Gunsten der alten oder jungen Erythrozyten vor?

2. Verschiebt sich der Schwerpunkt der Hämolyse - er ist durch den Wendepunkt der Hämolysekurve gekennzeichnet - durch Vorbehandlung mit ^{203}Hg oder $^{110\text{m}}\text{Ag}$?

Zur Klärung dieser Fragen wurden Versuche nach der beschriebenen Methode (s.S. 13) durchgeführt und festgestellt, ob die Peaks der Aktivität (^{59}Fe) und der Hämolyse koinzidieren. Eine Auswertung dieser Untersuchungen ergab (Abb.26), daß die Schwerpunkte der Hämolyse- und Aktivitätskurve zusammenfallen. Hieraus folgt, daß die osmotische Resistenz der jungen und der alten Erythrozyten sich innerhalb der Meßgenauigkeiten nicht unterscheidet.

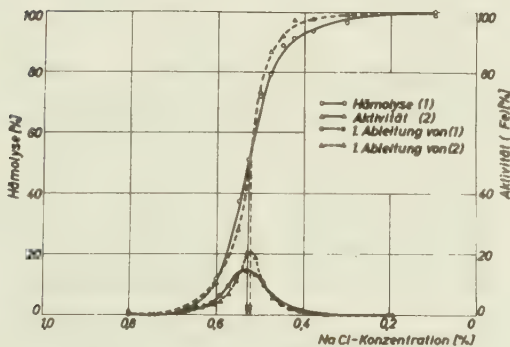


Abb.26. Verlauf der Hämolyse und Aktivität einer Erythrozytenpopulation, in der die jungen (maximal 6 Tage alten) Zellen mit ^{59}Fe markiert sind. Die Ableitungen beider Kurven, die als deren Differential die Schwerpunkte der Hämolyse und der Aktivität charakterisieren, sind eingezeichnet.

III.2.5

Verteilung der aufgenommenen Radioaktivität auf die verschiedenen Organe

Der Einfluß der Beladung der Erythrozyten mit ^{197}Hg bzw. $^{110\text{m}}\text{Ag}$ auf die Verteilung der Aktivitäten in den verschiedenen Organen wurde an 21 Kaninchen ermittelt und die Ergebnisse bezüglich der relativen (auf das Organ mit der höchsten Aktivität bezogen) spezifischen Organaktivität dargestellt (Abb.27,28). Die Tötung der Tiere erfolgte, nachdem die Elimination der Erythrozyten aus der Blutbahn weitgehend abgeschlossen war.

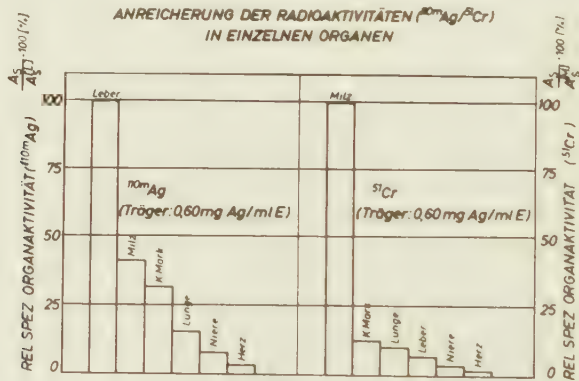


Abb.27. Anreicherung der Aktivität ($^{110\text{m}}\text{Ag}/^{51}\text{Cr}$) in den einzelnen Organen 4 Tage nach Injektion der simultan markierten Erythrozyten.

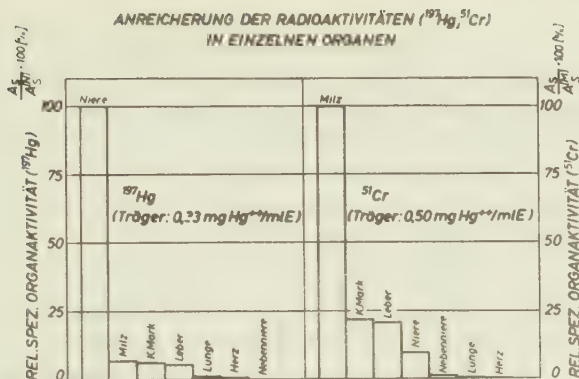


Abb.28. Anreicherung der Aktivitäten (^{197}Hg , ^{51}Cr) in den einzelnen Organen, 1 Tag nach Injektion der markierten Erythrozyten.

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse dieser Untersuchungen findet sich in den Tabellen 9-12. Hieraus ergeben sich folgende Hinweise:

1. Innerhalb der Niere ist die Aktivität bei ^{197}Hg - und ^{203}Hg -Markierung in der Rinde ca. 100 mal höher als im Nierenmark.

Gleiche Untersuchungen an Nebenniere und einzelnen Leberlappen ergaben keinen Unterschied: Die Verteilung der Aktivität erfolgte homogen.

Hingegen wurde beim Vergleich Fundus/Pylorus des Magens bei ^{51}Cr -Markierung und Beladung mit inaktivem Hg regelmäßig eine um ca. 100 % höhere spezifische Aktivität im Fundus gemessen.

2. Die Anreicherung der Aktivität in der Niere und der Leber scheint nach ca. 6-8 Stunden maximal zu sein. Nach dieser Zeit begann nämlich eine verstärkte Ausscheidung per vias naturales. Es war in allen Versuchen eine auffällige Beziehung zwischen Aktivität der Leber und des Darmtraktes bzw. zwischen Niere- und Harnradioaktivität zu beobachten.

3. Für alle untersuchten Gewebe hing die vorgefundene spezifische Aktivität streng von der Höhe der injizierten Impulse ab. Hier scheint das Hirngewebe insofern eine Ausnahme zu machen, als eine Erhöhung der injizierten Aktivität um ca. 30 % keine entsprechende Erhöhung der spezifischen Organaktivität erkennen ließ. In allen Fällen lag die relative, spezifische Aktivität bei ca. 0,1 %.

4. Obwohl mehrfach unterschiedliche Erythrozytenvolumina reinjiziert wurden (0,2 bis 1,6 ml; größere Mengen zu injizieren setzte eine entsprechend größere Blutentnahme voraus, die einen Reiz auf das RHS und das Knochenmark darstellt und möglicherweise die Elimination auf diesem Wege beeinflusst), war keine Abhängigkeit der Elimination von dem injizierten Erythrozytenvolumen innerhalb dieser Grenzen zu erkennen.

5. Der Hauptteil der insgesamt injizierten Aktivität war noch bis 30 min. nach Injektion der Erythrozyten an diese gebunden. Dies trifft für alle verwendeten Isotope und alle Versuchsbedingungen zu (siehe auch Halbwertszeiten Tab.13). Die Werte der Anteile der Gesamtaktivität in den Tabellen 9 bis 12 sind nur für die wichtigsten Organe angegeben und lassen erkennen, daß der größte Teil der injizierten Aktivität bereits ausgeschieden ist oder sich im meterlangen Darmtrakt, dessen Organaktivität sich nur durch sehr mühsame Untersuchungen bestimmen läßt, befindet.

Tab.9.

Organ	$^{110m}\text{Ag}/\text{Träger: } 0,6 \text{ mg } [\text{Ag}(\text{CN})_2]^- \text{ ml Erythrozyten}$			
	Sektion nach 4 d		Sektion nach 5 d	
	rel. spez. Organakt.	Anteil der Gesamaktivität pro Org. (%)	rel. spez. Organakt.	Anteil der Gesamaktivität pro Org. (%)
Leber	100,0	59,8	100,0	4,8
Milz	3,0	0,001	40,7	0,02
Knochenmark	0,9		32,7	
Lunge	0,4		15,88	
Niere	0,2	0,001	7,87	0,1
Nebenniere	0,0		10,52	
Herz	0,0		3,7	
Gehirn	0,0		0,0	
Schilddrüse	1,7		14,9	
Magen	0,3		10,1	
Duodenum	3,4		20,0	
Appendix	0,6		10,5	
Coecum	0,2		31,4	
Colon desc.	0,2		24,8	
Mageninhalt	3,8		218,0	
Coecuminhalt	16,0		237,0	
Urin	0,2		0,4	

Tab.10.

Organ	$^{197}\text{Hg}/\text{Träger } 0,33 \text{ mg } \text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$			
	Sektion nach 1 d		Sektion nach 3 d	
	rel. spez. Organakt.	Anteil der Gesamaktivität pro Org. (%)	rel. spez. Organakt.	Anteil der Gesamaktivität pro Org. (%)
Leber	5,5	16,8	6,0	8,9
Milz	6,9	0,02	4,1	0,005
Knochenmark	6,6		2,2	
Lunge	1,1	0,3	1,0	0,1
Niere	100,0	35,0	100,0	15,0
Nebenniere	0,1		0,8	
Herz	0,6		0,4	
Gehirn	0,1		0,0	
Pylorus	0,3		0,3	
Duodenum	1,3		-	
Appendix	2,3		3,6	
Coecuminhalt	-		4,3	
Urin	5,1		0,3	

Tab.11

Organ	51			
	Träger: 0,6 mg $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ / ml Erythrozyten		Träger: 1,0 mg $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ / ml Erythrozyten	
	rel. spez. Organakt.	Anteil der Gesamtakti- vität pro Org. (%)	rel. spez. Organakt.	Anteil der Gesamtakti- vität pro Org. (%)
Leber	6,9	0,4	2,0	6,2
Milz	100,0	1,8	100,0	5,0
Knochen	12,9		46,4	
Lunge	10,9		0,2	
Niere	3,7		1,2	
Nebenniere	-		-	
Herz	2,5		0,0	
Gehirn	-		-	
Schilddrüse	3,4		-	
Magen	0,6		-	
Duodenum	2,7		0,1	
Appendix	0,9		0,2	
Coecum	0,4		0,3	
Colon desc.	1,4		0,2	
Mageninhalt	3,1		-	
Coecuminhalt	6,0		0,1	
Urin	4,9		-	

Tab.12

Organ	Träger: 0,33 mg $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$		Träger: 0,5 mg $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	
	rel. spez. Organakt.	Anteil der Gesamtakti- vität pro Org. (%)	rel. spez. Organakt.	Anteil der Gesamtakti- vität pro Org. (%)
Leber	8,6	30,0	20,61	34,0
Milz	100,0	0,2	100,0	3,0
Knochenmark	7,0		22,0	
Lunge	1,7	3,0	0,8	0,3
Niere	8,9	2,0	-	0,5
Nebenniere	1,6	-	1,5	-
Herz	0,7		0,6	
Gehirn	0,1		0,1	
Pylorus	0,3		0,1	
Fundus	0,7		0,2	
Duodenum	2,4		2,8	
Appendix	3,6		2,6	
Coecum	-		2,6	
Colon desc.	-		2,4	
Urin	20,3		3,0	

Statistische Ergebnisse der In-vivo-Versuche

1. Die Streuung der Versuchswerte wurde durch Einzeichnen der $2s_{\bar{x}}$ -Werte in die Abbildungen veranschaulicht.

2. Durch die Methode der Zerlegung komplexer Exponential-Funktionen - für die die Abb.29 als Beispiel angeführt ist - ergaben sich folgende Werte für $t_{1/2}$ und die Geschwindigkeitskonstante k der Elimination (Tab.13, 14):

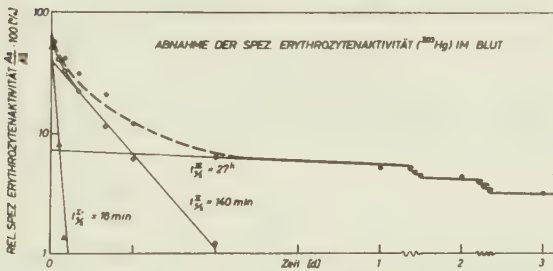


Abb.29. Elimination der Erythrozyten bei Beladung mit ^{203}Hg . Zerlegung der komplexen Kurve in ihre Komponenten. Die Geraden stellen die reinen Exponentialfunktionen des komplexen Kurvenverlaufs dar.

Wie aus Tab.13 zu ersehen, nimmt die Halbwertszeit für steigende Träermengen bei Markierung mit dem gleichen Isotop ab, d.h. die Elimination wird größer.

Die Geschwindigkeitskonstante k der Elimination wird nach der Formel $k = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$ errechnet; hiernach ergeben sich für die einzelnen Versuche folgende Resultate (Tab.14).

Tab.13. Ermittlung der Halbwertszeiten der Einzelkomponenten durch Zerlegung des komplexen Kurvenverlaufs im halblogarithmischen Koordinatensystem.

Isotop	Trägersubstanz	Halbwertsz. d. Komponente		
		I	II	III
^{203}Hg	ohne Trägers.	18 min.	140 min.	27 h
^{51}Cr	0,33 mg $\text{Hg}^{++}/\text{ml E}$	63 min.	245 min.	9,2 h
^{197}Hg	0,33 mg $\text{Hg}^{++}/\text{ml E}$	2 Min.	65 min.	8 h
^{51}Cr	0,50 mg $\text{Hg}^{++}/\text{ml E}$	1,5 min.	14 min.	75 min. *)
^{51}Cr	0,10 mg $\text{Ag}^{+}/\text{ml E}$	125 min.	3 d	-
$^{110\text{m}}\text{Ag}$	0,60 mg $\text{Ag}^{+}/\text{ml E}$	64 min.	155 min.	21 h
^{51}Cr	1,00 mg $\text{Ag}^{+}/\text{ml E}$	45 min.	60 min.	13,8 h
^{51}Cr	3,00 mg $\text{Ag}^{+}/\text{ml E}$	38 min.	52 min.	8,1 h

*) Die Kurve hat eine Komponente IV mit $t_{1/2} = 5,7 \text{ h}$.

Tab.14. Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k der Komponenten I, II, III aus den Werten der Halbwertszeiten (Tab.13).

Isotop	Trägersubstanz	k-Wert der Komponente		
		k_I	k_{II}	k_{III}
^{203}Hg	ohne Trägers.	$0,0385 \text{ min}^{-1}$	$0,0049 \text{ min}^{-1}$	$0,0256 \text{ h}^{-1}$
^{51}Cr	0,33 mg Hg^{++}/ml	0,0011 "	0,0028 "	0,0754 "
^{197}Hg	0,33 mg Hg^{++}/ml	0,346 "	0,0011 "	0,0865 "
^{51}Cr	0,50 mg $\text{Hg}^{++}/\text{ml E}$	0,462 "	0,0495 "	$0,0092 \text{ min}^{-1}$
^{51}Cr	0,10 mg $\text{Ag}^{+}/\text{ml E}$	0,0055 "	$0,231 \text{ d}^{-1}$	
$^{110\text{m}}\text{Ag}$	0,60 mg $\text{Ag}^{+}/\text{ml E}$	0,0011 "	$0,0045 \text{ min}^{-1}$	$0,032 \text{ h}^{-1}$
^{51}Cr	1,00 mg $\text{Ag}^{+}/\text{ml E}$	0,0154 "	0,0115 "	0,05 "
^{51}Cr	3,00 mg $\text{Ag}^{+}/\text{ml E}$	0,0182 "	0,0133 "	0,086 "

Durch die beschriebene Transformation (s.S.18) war lediglich bei den In-vitro-Versuchen eine Linearität zu erreichen. Die gleiche Transformation auf die In-vivo-Versuche angewendet, ergab die in Abb.30 dargestellte Streuung. Demgegenüber konnte die Methode der Zerlegung komplexer Exponential-Funktionen nur bei den In-vivo-Versuchen zur Anwendung gelangen, da die Einzelkurven sich durch eine Gleichung von der Form $y = Ae^{-kt}$ beschreiben lassen, während der Verlauf der Inkorporation bei den In-vitro-Versuchen offenbar einer Beziehung von der Form $y = A(1-e^{-kt})$ gehorcht.

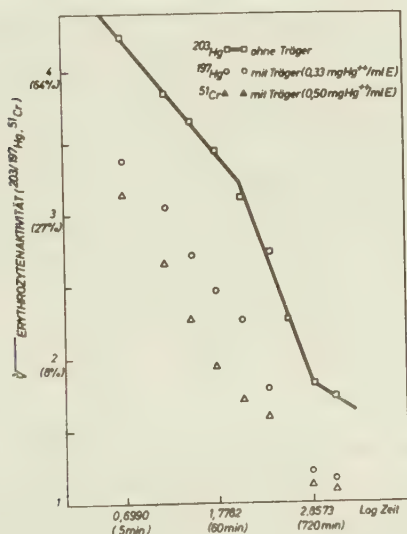


Abb.30. Beziehung zwischen Zeit und Aktivität ($^{203}/^{197}\text{Hg}$, ^{51}Cr) für einzelne Behandlungen (In-vivo-Versuche). Die nicht transformierten Werte der Koordinaten sind in Klammern vermerkt. Es besteht - im Vergleich zu den In-vitro-Versuchen (Abb. 16,17) - schlechte Korrelation. Eingezeichnet wurde die "Regressionsgerade" für den ^{203}Hg -Versuch.

3. Die Ergebnisse der doppelten Varianzanalyse mit Wiederholungen sind für Markierung mit ^{203}Hg bereits erwähnt (s.S.20 ff.).

Bei Verwendung von ^{110m}Ag bzw. ^{51}Cr und $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ als Trägersubstanz in Mengen von 0,1; 0,6; 1,0 und 3,0 mg $\text{Ag}^+/\text{ml E}$ (s.Abb.22) ergaben sich folgende Resultate (Tab.15).

Tab.15. Ergebnisse der doppelten Varianzanalyse mit Wiederholungen bei $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ als Trägersubstanz.

Art d. Streuung	SAQ	FG	MAQ
zwischen A (Zeiten)	38589,85	5	7717,97
zwischen B (Träger)	35490,86	3	11830,28
Wechselwirkung AB	6463,00	15	430,87
Versuchsfehler	438,56	48	9,1367
Streuung insg.	80982,27	71	

Entsprechend den für die Inkubation mit ^{203}Hg gefundenen Werten (Tab.5) ergibt die Prüfung der Wechselwirkung, des Einflusses der Trägermenge und der Auswirkung der Inkubationsdauer, daß in jedem Falle statistische Signifikanz vorliegt und der Versuchsfehler mit ca. 9,1 gering gehalten wurde.

4. Die statistische Signifikanz der Unterschiede der relativen spezifischen Organaktivitäten konnte durch die doppelte Varianzanalyse nicht ermittelt werden, da die Voraussetzung zur Anwendung dieser Methode - Varianz zwischen den Meßwerten - nicht gegeben war.

Bei Betrachtung der als Beispiel angeführten Einzelwerte (Tab.16) ist deren Signifikanz aber offensichtlich und somit die Anwendung einer statistischen Methode in diesem Falle nicht notwendig: Die Streuungen der relativen spezifischen Organaktivitäten für das gleiche Organ bei verschiedenen Kaninchen sind geringer als die Unterschiede der relativen spezifischen Organaktivitäten für verschiedene Organe bei dem gleichen Versuchstier.

Tab.16. Relative spezifische Organaktivitäten (^{51}Cr) für drei Versuchstiere bei Verwendung von 0,60 mg $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-/\text{ml}$ Erythrozyten als Trägersubstanz.

$$\text{Aktivitätsangabe: } \frac{A_s}{A_s \text{ Milz}} \cdot 100 \%$$

(Das Organ mit der größten spez. Aktivität wurde jeweils als 100 %-Wert geführt.)

Versuchstier	Milz	Leber	Niere	Lunge	Herz	Knochenmark
1	100	6,66	3,71	9,78	2,63	13,01
2	100	7,19	3,78	11,19	2,73	13,20
3	100	6,90	3,59	10,58	2,09	12,62

IV. Diskussion der Ergebnisse

IV.1

In-vitro-Versuche

Der Einbau ist vom pH-Wert in mehr oder weniger großem Umfang abhängig (82). Daher wurden in den vorliegenden Versuchen alle Verbindungen in isotonischer NaCl-Lösung und einem pH-Wert um 7,00 untersucht.

Da nur jede Woche einmal frisches Rinderblut zur Verfügung stand und an mehreren Tagen gearbeitet werden mußte, ist hier mit Schwankungen zu rechnen. Es ließ sich zeigen, daß schon 24-stündiges Stehen zu meßbaren Strukturveränderungen der Erythrozytenmembran führt (18). Der auf Erythrozyten beschriebene Plasma-Protein-Film scheint bis auf strukturbildende Eiweißadsorbate durch das beschriebene Zentrifugieren und Waschen der Erythrozyten entfernt zu sein (62).

Die vorliegenden Versuchsergebnisse sollen noch einmal unter Berücksichtigung der in der Einleitung formulierten Aufgabenstellung ausgewertet und zusammengestellt werden.

IV.1.1

Inkubation und Elution mit ^{203}Hg und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der Erythrozyten (Plasmasuspension)

Werden Erythrozyten in einem geschlossenen System bei 4°C gelagert, so kann mit zunehmendem Erythrozytenalter eine Erhöhung (signifikant bei Markierung mit ^{203}Hg ; statistisch auffällig bei Verwendung von $^{110\text{m}}\text{Ag}$) sowohl der Inkorporationsrate als auch der Inkubationsausbeute beobachtet werden. Dieser Befund deutet darauf hin, daß aufgrund einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran alte Zellen die angebotene trägerfreie ^{203}Hg - bzw. die trägerhaltige $^{110\text{m}}\text{Ag}$ -Aktivität schneller aufnehmen als junge.

Die Annahme der erhöhten Permeabilität lenkt den Blick auf das Problem der Alterung der Erythrozyten:

Eine Zunahme der Permeabilität der Erythrozytenmembran bei Lagerung der Zellen wurde erstmals 1958 beschrieben (11) und ist an dem Ausgleich der intra- und extrazellulären Elektrolytkonzentrationen zu verifizieren (49,53, 54,67,69). Während die Veränderungen an der Membran in den ersten 10 Tagen noch reversibel sind (55), ist eine Änderung des intrazellulären Stoffwechsels - er tritt bei Lagerung der Erythrozyten vorwiegend ab der 2. Woche auf - für die Zelle deletär.

Untersuchungen von Gabrio, Donohue und Finch (19,20, 33,34) zeigten allerdings, daß durch Zusatz von Adenosin eine Regeneration von organischem Phosphat möglich und somit eine Alterung der Zellen aufzuhalten ist, eine Erkenntnis, die für die Lagerung von Blutkonserven praktische Bedeutung gewinnt.

Neben der Erhöhung der Permeabilität, die von Loutit et al. (55) durch Veränderungen an der Erythrozytenzellmembran erklärt wird, nimmt ab dem 7. Tag der Lagerung die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH) bis 40 % (53), nach Rapoport 50 bis 70 % (67) ab. Hierdurch verringert sich der intrazelluläre Phosphatstoffwechsel. Weitere Folgen sind der Anstieg der Gesamtazidität auf das 8-fache (67) bis 20-fache (53), der Abfall der Brenztraubensäure (53,54) und die Herabsetzung des Glucoseabbaus (75).

Da nach Bechhold (6) und Pranker (63) ATP zusammen mit anderen Phosphaten abnimmt und ATP eine Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der intra- und extrazellulären Elektrolytkonzentration darstellt, ist deren Ausgleich (s. oben) leicht verständlich.

Neben einer gesteigerten Membranpermeabilität könnten zur Deutung der Erhöhung der Inkubationsausbeute der gealterten Erythrozyten alle die Faktoren beitragen, die eine Veränderung des intrazellulären Stoffwechsels dahingehend bedingen, daß mehr Thiolgruppen zur Bindung der Schwermetallisotope zur Verfügung stehen.

Zur Frage des vorliegenden Markierungsmechanismus wird angenommen, daß die Bindung der Schwermetallisotope ^{203}Hg und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ durch SH-Gruppen erfolgt, eine Reaktion, die aufgrund ihres Ionencharakters und der vorliegenden Gleichgewichtslage in trägerarmer Lösung sehr rasch und vollständig ablaufen sollte. Die Beobachtung, daß letztere Erwartung nur bei der Inkorporation mit $^{110\text{m}}\text{Ag}$ erfüllt ist, legt die Vermutung nahe, daß die Aufnahme von ^{203}Hg durch die Zellmembran behindert ist. Da aber durch eine Lagerung diese Behinderung verringert wird - die Permeabilität steigt - müßte die Zunahme der Inkorporation bei den Lagerungsversuchen von ^{203}Hg prozentual größer sein als die bei Verwendung von $^{110\text{m}}\text{Ag}$. Unsere dargestellten Ergebnisse (Abb.4,5) lassen eine größere Zunahme der Inkorporation von ^{203}Hg erkennen.

Der Befund der hohen Affinität der Zellbestandteile, besonders zu $^{110\text{m}}\text{Ag}$, und die geringe Elution wird durch die Annahme einer weitgehend irreversiblen Verbindung zwischen Isotop und SH-Gruppen-haltigen Elementen in der Zelle hinreichend erklärt.

Die Versuche zur Feststellung der heterogenen Beladung der Erythrozyten mit Schwermetallen (Hg, Ag) innerhalb einer Population bestätigten die Anreicherung in gealterten Zellen und ermöglichten zudem eine quantitative Aussage über den jeweiligen Anreicherungsfaktor (s.S. 46).

IV.1.2

Inkubation und Elution mit ^{203}Hg und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Geschwindigkeit einer Reaktion nimmt mit steigender Temperatur zu. Die ^{203}Hg -Aufnahme folgt, wie die vorliegenden Versuchsergebnisse zeigen, diesem physikalischen Gesetz. Für $^{110\text{m}}\text{Ag}$ konnte diese Aussage statistisch nicht gesichert werden. Eine genaue Analyse des Verlaufs der Inkorporation bei Temperaturanstieg durch Mundschenk (58) ergab für die Markierung mit ^{203}Hg , daß die Stoffaufnahme

durch eine Reaktion 2. Ordnung dargestellt werden kann und mit einer relativ niedrigen Aktivierungsenergie von ca. 8,2 kcal/M abläuft.

IV.1.3

Einfluß einer Vorbehandlung mit isotonischer NaCl-Lösung (Waschen) auf Inkubations- und Elutionsverlauf

In verschiedenen Arbeiten wurde festgestellt, daß der Erythrozyt von einem Proteinfilm überzogen ist, der mit den Plasmateilchen im Gleichgewicht steht (48,64,70,88,90). Wird dieser Proteinfilm durch mehrmaliges Waschen mit isotonischer Kochsalzlösung entfernt, so kann mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Membran gerechnet werden. Es ist naheliegend anzunehmen, daß die mit der Zahl der Waschungen eintretende Steigerung der Inkubationsausbeute (Abb.7) auf eine solche Erhöhung der Membranpermeabilität zurückzuführen ist.

Darüber hinaus sind die bei der Inkubation in Plasma-suspension erniedrigten Werte wohl so zu erklären, daß die Isotope durch verschiedene Plasmaanteile gebunden werden. Dies trifft jedoch für ^{203}Hg nur bedingt zu, da die Bindekapazität des Plasmas gegenüber ^{203}Hg nach Mund-schenk (58) beschränkt ist: "Wird Plasma mit ^{203}Hg für maximal 2 Stunden inkubiert und anschließend hierin Erythrozyten resuspendiert, so ist die Inkubationsausbeute in einem auch nicht annähernd der Erwartung entsprechendem Umfange herabgesetzt."

Wie erwähnt (s.S. 58), ist die bei gealterten Zellen beobachtete erhöhte Ausbeute sehr wahrscheinlich auch auf eine gesteigerte Membranpermeabilität zurückzuführen.

IV.1.4

Einfluß eines Zusatzes von $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bzw. $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ als Trägersubstanz auf Inkubations- und Elutionsverlauf mit und ohne Vorbehandlung mit isotonischer NaCl -Lösung

Alle verwendeten $^{110\text{m}}\text{Ag}$ -Chargen waren mit Träger $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ versetzt, da trägerfreies $^{110\text{m}}\text{Ag}$ nur durch sehr kostspielige Verfahren hergestellt werden kann. Das Cyanid aber ist als Zellgift bekannt: Die Wirksamkeit der Carboanhydrase der Erythrozyten ist an Zn gebunden; sie erlischt - nach Meldrum und Roughton - bei Inaktivierung des Metalls durch Cyanid (56). Außerdem reduziert $[\text{CN}]^-$ die Vorräte an energiereichen Phosphaten (30a). Beides mag die Ursache dafür sein, daß $^{110\text{m}}\text{Ag}$ besonders bei Zugabe größerer Aktivitäten die Erythrozyten stark alteriert und irreversibel (Elution unter 1 %) mit fast maximaler Inkubationsausbeute (zwischen 95 % und 100 %) und in kurzer Inkubationszeit (5 min.) markiert.

Da für die Trägersubstanz $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ derartige intrazelluläre Reaktionen nicht aufzuzeigen sind, wären alle Unterschiede im Verhalten beider Isotope möglicherweise auf die verschiedene Trägersubstanz zurückzuführen.

IV.1.5

Markierung mit $^{110\text{m}}\text{Ag}$ bei $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}$ als Trägersubstanz mit und ohne KJ -Zusatz

Mundschenk und Fischer (57) schlossen aus ihren Versuchen mit BMHP, daß sich die Substanz auf der Erythrozytenoberfläche abscheidet und diese Aggregate die in der Membran lokalisierten funktionellen Vorgänge so beeinflussen, daß der nunmehr alterierte Erythrozyt aus der Blutbahn eliminiert wird. Ziel der vorliegenden Versuche war, Ag über eine spontane Fällungsreaktion auf der Erythrozytenoberfläche abzuscheiden.

Wie die Ergebnisse zeigen (Abb.14), wird durch Zugabe von $\text{Ag}(\text{NH}_3)\text{Cl}$ die Inkorporation von $[\text{}^{110\text{m}}\text{Ag}(\text{CN})_2]$ - gehemmt. Gleichzeitiger KJ-Zusatz vermag die Inkubationsausbeute um ca. 50 % zu steigern. Diese Befunde können wohl so gedeutet werden, daß durch $\text{Ag}(\text{NH}_3)\text{Cl}$ die Permeabilität der Zellmembran des Erythrozyten für das Isotop verringert wird oder die Trägermoleküle eine größere Affinität zu den SH-Gruppen der Membran bzw. des Zellinneren besitzen und es sich um eine Konkurrenzreaktion am gleichen Rezeptor, den Thiolgruppen, handelt. Wird zu dem Vollblut zunächst KJ, danach der Träger und zuletzt die Aktivität zugesetzt, so bildet sich AgJ , das sich auf der Erythrozytenmembran niederschlägt, dessen Membran möglicherweise alteriert und die Permeation für die nachfolgende Markierung mit $^{110\text{m}}\text{Ag}$ verbessert.

Es handelt sich zudem wahrscheinlich vorwiegend um Vorgänge am Erythrozyten, die durch das umgebende Plasma nur geringfügig beeinflußt werden, da der gleiche Versuch in isotonischer NaCl -Lösung durchgeführt, keine wesentliche Zunahme der Inkubationsausbeute erkennen ließ.

IV.1.6 Inkorporation von ^{203}Hg und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ bei Leukozyten

Die Beobachtungen der In-vitro-Versuche zeigten, daß die Erythrozytenbestandteile eine größere Affinität zu $^{110\text{m}}\text{Ag}$ als zu ^{203}Hg aufweisen. (Die 5 min.-Werte der Inkorporation beider Nuklide in Plasmasuspension unterschieden sich z.B. um den Faktor 30 zu Gunsten von $^{110\text{m}}\text{Ag}$.)

Die Ergebnisse der Leukozyten- und Erythrozyten-Markierung bestätigten diese Befunde (s.S. 34): Die Inkorporation von $^{110\text{m}}\text{Ag}$ war bei Erythrozyten 20 mal höher, von ^{203}Hg aber 14 mal niedriger als bei Leukozyten.

Im Gegensatz zu unseren In-vitro-Befunden ergaben In-vivo-Versuche mit inaktivem Silber und Messungen der Erythrozytenaktivität ($^{108/110}\text{Ag}$) nach i.v. Injektion

dieser Isotope keine nennenswerte Anreicherung in den Erythrozyten: Untersuchungen von Stewart und Parker (77) hatten gezeigt, daß das Element von Leukozyten gespeichert und im Blut sowohl an Plasmaeiweiß gebunden (Blumberg und Carey (8)) als auch von phagozytierenden Zellen inkorporiert (Hooper und Meyer (44)) angetroffen wird; Befunde, die West et al. (84) zu Verteilungsstudien mit Radio-silber ($^{108/110}\text{Ag}$) veranlaßten. Als Ergebnis dieser Studien zeigte sich eine Silberkonzentration in infizierten Geweben, als deren Ursache die lokale Ansammlung von Leukozyten angenommen wird, die als Transportvehikel für Ag gelten.

Der negative Ausgang der Versuche ist erklärlich, da die erste Messung der Erythrozytenaktivität erst 72 Stunden post injektionem erfolgte und - nach unseren Erfahrungen - die markierten und alterierten Erythrozyten bereits aus der Blutbahn eliminiert waren. Allerdings müßte zu diesem Zeitpunkt in Leber und Milz eine hohe Organaktivität vorliegen. Ob dies für die Versuche von West et al. zutrifft, ist nicht zu sagen, da lediglich die Organaktivität von Herz und Lunge im Vergleich zu der des abszeßtragenden Gewebes angegeben ist.

Für ^{203}Hg hingegen haben Burch, Ray et al. (13) die Erythrozytenaktivität nach i.v. Injektion des Isotops an einem größeren Patientengut untersucht und nur eine verschwindende Anreicherung in Erythrozyten festgestellt, ein Befund, der mit unseren In-vitro-Ergebnissen durchaus übereinstimmt. Die erste Messung der Radioaktivität erfolgte schon 30 min. post injektionem.

Im Zusammenhang mit den in unseren Untersuchungen gefundenen Resultaten sind 2 Fragen zu klären:

1. Wie ist der Unterschied der Inkorporation ein und desselben Isotops (z.B. ^{203}Hg) zwischen Leukozyten und Erythrozyten zu verstehen?

2. Wie ist der Befund der hohen Inkubationsausbeute von ^{110m}Ag bei Erythrozyten gegenüber der großen Anreicherung von ^{203}Hg in Leukozyten zu interpretieren?

Ad 1) Die Ursache dafür, daß ein und dasselbe Isotop die Erythrozyten und Leukozyten unterschiedlich stark markiert, ist offenbar in dem verschiedenen Aufbau beider Zellarten zu suchen. Der verschiedene Aufbau des Erythrozyten und Leukozyten kommt schon in ihrer unterschiedlichen Funktion - aktive Beweglichkeit (32), Fähigkeit der Phagozytose (4), Haftfähigkeit an Oberflächen (41) - zum Ausdruck und wird durch folgende Faktoren (Tab.16) verdeutlicht.

Tab.16. Vergleich des Gehalts an Coenzymen bei Leukozyten und Erythrozyten.

Gehalt an	Erythrozyten	Leukozyten
Thionin (μ /100 ml) (31)	11,1	47
Kocarboxylase μ /10 ¹¹ Zellen (72)	1,5	290
Riboflavin (μ %) (14)	22,4	252
DPN (μ /ml) (14)	68,0	90

Ad 2) Wenn in der Deutung des Markierungsmechanismus (s.S.60) von einer Bindung beider Isotope an SH-Gruppen die Rede war, so wurde ein qualitativ gleicher Mechanismus mit quantitativen Unterschieden angenommen. Der Ausgang der obigen Versuche läßt jedoch einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus beider Nuklide unwahrscheinlich erscheinen oder zumindest neben einem solchen gemeinsamen, andere, und zwar verschiedene Bindungsmechanismen vermuten. Diese Schlußfolgerung ist allerdings nicht zwingend. Denn wenn beide Ionenspezies $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ und Hg^{++} sich hinsichtlich ihrer Ionenbeweglichkeit und Reaktionsgeschwindigkeit, was sicherlich zutrifft, unterscheiden, dann können trotz gemeinsamen Bindungspartners - SH-Gruppen - unterschiedliche Reaktionsabläufe beobachtet werden.

IV.2

In-vivo-Versuche

Insgesamt wurden 60 tierexperimentelle Untersuchungen an Kaninchen durchgeführt.

Obwohl die Versuchsbedingungen bei allen Experimenten nahezu gleich gehalten wurden - u.a. gleiches Gewicht und gleiches Geschlecht der Kaninchen einer Versuchsserie - konnten Streuungen (siehe $2s_{\bar{x}}$ -Werte) nicht verhindert werden. Diese Streuung ist durch die angewandte Methode nicht zu erklären. Als Deutung hierfür kommen in Betracht:

1. Eingriff in das ohnehin labile Blutsystem des Kaninchens durch eine Blutentnahme von 2 bis 3 ml. Ein Absinken der Erythrozytenzahlen um 1,5 Mill. innerhalb von 3 Stunden als Folge eines Blutverlustes von 10 ml wurde beobachtet (73).

2. Ungleichmäßige Verteilung der Erythrozyten in der Blutbahn des Kaninchens, besonders in der Milzvene (7).

3. Zeitliche Schwankungen der Erythrozytenzahl. Eine solche ist über größere Zeiträume, abhängig von der Jahreszeit bewiesen (71), als gesetzmäßige Tagesschwankung aber offensichtlich nicht vorhanden (22).

Der Einfluß dieser Faktoren ist im einzelnen nur schwer zu objektivieren, so daß im Rahmen dieser Arbeit der Hinweis auf derartige Fehlerquellen genügen muß.

IV.2.1

Zeitabhängige Elimination von mit ^{203}Hg ; $^{110\text{m}}\text{Ag}$ markierten und alterierten Erythrozyten aus der Blutbahn

Wie aus den vorliegenden Versuchsergebnissen zu ersehen ist, war eine Erythrozytenlebenszeitbestimmung mit ^{203}Hg und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ nicht möglich. Für diese Tatsache machen wir, wie angedeutet (s.S.41), im wesentlichen 2 Faktoren verantwortlich:

1. Chemische Alteration der Erythrozyten durch die verwendeten Substanzen.

2. Heterogene Verteilung der Isotope auf die verschiedenen Altersgruppen der gesamten Zellpopulation.

Ad 1) Der Alterationseffekt der zur Inkubation verwendeten Substanzen ist sicherlich auf deren Trägerzusatz zurückzuführen. Der Einfluß des Trägers auf die Alteration der Erythrozyten wurde mittels einer doppelten Varianzanalyse mit hoher Signifikanz nachgewiesen.

^{110m}Ag wurde immer mit mehr oder weniger großen Trägermengen zur Markierung verwendet. Die Elimination der ^{110m}Ag -beladenen Erythrozyten erfolgte - wie aus einem Vergleich der Abbildungen 18 und 19 sowie aus den Tabellen 13 und 14 zu ersehen ist - jedoch nicht so schnell wie bei Markierung mit ^{203}Hg . Dieser Befund widerspricht nicht den Ergebnissen der In-vitro-Versuche, die eine statistisch signifikant höhere Einbaurrate und eine geringere Elutionsausbeute von Ag im Vergleich zu Hg erkennen ließen, da diese Ergebnisse nichts über eine evtl. Alteration der Erythrozyten aussagen. Die Einbaurrate und -geschwindigkeit von ^{110m}Ag ist zwar größer, der Alterationseffekt aber bei äquivalenter Beladung etwas geringer als der von ^{203}Hg . Für die Tatsache einer geringeren Alteration spricht auch der Befund, daß bei Simultanmarkierung ($^{51}\text{Cr}/^{110m}\text{Ag}$) die Aktivität (^{51}Cr) weniger abfällt als bei Simultanmarkierung mit ^{197}Hg . Außerdem ist der Alterationseffekt von 0,1 mg Ag^+/ml erstaunlich gering (Abb.22).

Ad 2) Unter der Annahme, daß die alten Erythrozyten 50 % mehr ^{203}Hg bzw. 30 % mehr ^{110m}Ag aufnehmen als junge (s. S.46) würde der Abfall der spez. Erythrozytenaktivität vorwiegend auf das Konto gealterter Zellen gehen. Dies ist auch naheliegend, da bei einer solchen Mehrbeladung mit Aktivität der Alterationseffekt entsprechend erhöht wird.

Ob die erhöhte Elimination von ^{203}Hg - zu $^{110\text{m}}\text{Ag}$ -beladenen Erythrozyten ausschließlich durch den 15 bis 20-prozentigen Unterschied der Mehrbeladung gealterter Erythrozyten zu erklären ist, liegt zwar nahe, mußte aber erst statistisch gesichert werden.

In weiteren Versuchen wurde die Verteilung der Aktivität auf Leukozyten geprüft. Es ergab sich für Hg eine Anreicherung um den Faktor 14, während für Ag eine Abreicherung um den Faktor 20 festgestellt werden konnte. Ein Einfluß auf den Abfall der spez. Erythrozytenaktivität kann somit nur bei Verwendung von Hg als relevant angenommen werden. Die Größe dieses Einflusses ist nur schwer exakt zu bestimmen, da man die genauen Leukozyten und Erythrozytenwerte des betreffenden Kaninchens nachträglich errechnen mußte. Die Angaben der Durchschnittswerte schwanken nämlich nach Bings (15) um 20 %. Folgende Mittelwerte sind angegeben: Erythrozyten = 5989500 (Abweichung 14 %); Leukozyten = 10675. Das Verhältnis Erythro- zu Leukozyten = ca. 600:1 wird zwar durch die 14-fach Mehrbeladung der Leukozyten etwas verschoben, der Einfluß der Leukozyten auf den Kurvenverlauf bleibt aber mit ca. 40:1 sehr gering (ca. 2,5 %).

Zusammenfassend lassen sich also beide Hypothesen, Alteration und heterogene Verteilung, als Ursachen des starken Abfalls der spez. Erythrozytenaktivität verifizieren, wobei die Alteration der Erythrozyten, welche im Gegensatz zur heterogenen Verteilung abhängig von der Trägermenge ist, quantitativ überwiegt. Eine genauere quantitative Aussage über die Größe beider Faktoren war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich und muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Threefoot, Ray, Burch et al. (78) untersuchten den Konzentrations-Zeitablauf für ^{203}Hg im Plasma bei Patienten. Der Abfall der ^{203}Hg -Konzentration im Plasma schien hierbei aus drei, in Form von Exponentialfunktionen ver-

laufenden Abschnitten zusammengesetzt, wie dies in gleicher Weise für den Abfall der spez. Erythrozytenaktivität von uns festgestellt wurde (s.S.53). Spätere Untersuchungen von Borghgraef, Kessler und Pitts (9) konnten nach i.v.Injektion von ^{203}Hg -Chlormerodrin bestätigen, daß der Abfall der Plasmaaktivität/sich durch eine komplexe Exponentialfunktion beschreiben läßt.

Wie durch Nephrektomie eindeutig gezeigt werden konnte, wurde die dritte Exponentialfunktion (siehe zum Vergleich Abb.29) durch die renale Ausscheidung bestimmt. Dies scheint auch für unsere Versuche zuzutreffen (Abb.29; III).

IV.2.2 Simultanmarkierung mit $^{197}\text{Hg}/^{51}\text{Cr}$ bzw. $^{110\text{m}}\text{Ag}/^{51}\text{Cr}$

Bei den Simultanbestimmungen mit ^{51}Cr und ^{197}Hg (^{203}Hg ist wegen der nahezu gleichen Peaklage nur durch aufwendige Berechnung von der ^{51}Cr -Aktivität zu diskriminieren) bzw. mit ^{51}Cr und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ konnte zwischen dem Aktivitätsverlauf der beiden Isotope keine Übereinstimmung erzielt werden. Dieses Ergebnis ist eine weitere Bestätigung unserer Interpretation des raschen Abfalls der Erythrozytenaktivität. Hieraus folgt nämlich, daß neben einem chemischen Alterationseffekt eine heterogene Verteilung der Aktivität auf die verschiedenen Altersstufen der Erythrozytenpopulation vorliegen muß. Bei homogener Verteilung beider Isotope wäre der gleiche Verlauf der spez. Erythrozytenaktivität von ^{51}Cr und dem zweiten Nuklid zu erwarten.

Andererseits könnte es sich auch um eine Elution der auf der Erythrozytenmembran abgeschiedenen Isotope handeln, so daß man evtl. mit einer Lösung der mit den SH-Gruppen eingegangenen Bindung oder aber mit dem Austritt der das Hg^{++} bzw. Ag^+ gebunden enthaltenden Zellbestandteile rechnen kann (Mundschenk, Fischer (57)). Diese Interpretation widerspricht allerdings den Ergebnissen

der In-vitro-Versuche , deren Elutionsanteile für Ag z.B. unter 1 % lagen.

IV.2.3

Der Einfluß eines Zusatzes von $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ bzw. $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ auf die Elimination der Erythrozyten aus der Blutbahn (s.S. 62,67).

IV.2.4

Die Verteilung der aufgenommenen Radioaktivitäten auf die verschiedenen Organe

Die in unseren Versuchen festgestellten Ergebnisse sind in den Tabellen 9 bis 12 und den Abbildungen 27 und 28 wiedergegeben.

Aus der Verteilung der Aktivitäten auf die verschiedenen Organe geht hervor, daß neben der phagozytierenden Aktivität der Leber (Ag) und der Ausscheidungsfähigkeit der Niere (Hg) die Sequestrationsfunktion der Milz bei diesem Vorgang die entscheidende Rolle spielt. Voraussetzung hierfür ist, daß bei der Alteration die Oberfläche der Zellen in einer noch unbekannten Weise verändert wurde oder aber der Erythrozyt bei dieser Behandlung einige zur Aufrechterhaltung seiner Funktion notwendige Eigenschaften (z.B. Plastoelastizität, intakte SH-Gruppen an der Zelloberfläche) einbüßt (57).

Von Borggraef und Pitts (9) wurde an Hunden und Ratten die Bindung von ^{203}Hg durch die Gewebe verschiedener Organe (Leber, Darm, Milz, Lunge, Herz) nach einmaliger Gabe von markiertem Chloromedrin studiert. Die stärkste Radioquecksilberkonzentration fand sich in der Niere (80 %); sie wurde von keinem anderen Gewebe auch nur annähernd erreicht. Ähnliche Versuche wurden von Aikawa und Fitz (2) beim Menschen durchgeführt. Die Autoren verabreichten ^{203}Hg -markiertes Mercaptomerin-Natrium (Thiomerin) bei Patienten in terminalen Stadien ihrer Erkrankung. Bei der Autopsie und Gewebsanalyse war die Aktivität in den Nieren 3 mal so hoch wie in der Leber, dem Organ mit der

nächst höheren ^{203}Hg -Konzentration. Hierbei enthielt das Gewebe der Nierenrinde ca. 2 mal so viel Radioquecksilber wie das Markgewebe (in unseren Versuchen konnte ein Faktor von 100 gefunden werden). Dieses Auftreten starker Hg-Konzentration in der Nierenrinde und schwächer im Nierenmark läßt sich gut mit der Annahme vereinen, daß sich die Hg-Diuretika besonders in den distalen oder proximalen Tubuli anreichern (59).

Giebisch und Dorman (37) untersuchten die Aufnahme und Verteilung von ^{203}Hg als radioaktivmarkiertes Chlormerodrin (Neohydrin) an Kalt- und Warmblütern. Bei allen Tieren zeigten sich die gleichen Ergebnisse wie beschrieben.

Ray, Burch, Threefoot und Kelly (68) konnten hohe Aktivitäten in der Galle nachweisen, was in Anbetracht ihrer Schwermetall eliminierenden Funktion zu erwarten war.

West, Johnson, Johnson (85) ermittelten die Verteilung des radioaktiven Silbers ($^{108/110}\text{Ag}$) auf die verschiedenen Organe von Albinoratten. Wie bei unseren Versuchen fanden die Autoren hohe Silberwerte der Faeces. Sie zeigen an, daß die Eliminierung des Metalls intestinal, wahrscheinlich über die Galle erfolgt. Für eine hepatische Ausscheidung sprachen auch die hohen spez. Organaktivitäten der Leber in unseren Versuchen. Gamill und Wheeler (35) konnten in einer weiteren Studie, an Nagern durchgeführt, die Ausscheidung über den Intestinaltrakt bestätigen.

IV.2.5. Versuch mit ^{59}Fe -Markierung

Den Eiseneinbau in die Erythrozyten untersuchten wir mit ^{59}Fe : Die Markierung der Erythrozyten kann nur der lebende Organismus über die Erythropoese vornehmen (38,39). Der Hauptteil des im Plasma umgesetzten Eisens gelangt ins Knochenmark und wird von den Erythroblasten für die Häm-

globinsynthese verwandt. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs läßt sich im peripheren Blut durch tägliche Messung der ^{59}Fe -Aktivität bestimmen und wurde erstmals von Finch, Gibson, Peacock und Fluharty 1949 durchgeführt (24) (Abb.24). Ein Austausch zwischen Plasmaeisen und dem in Erythrozyten gebundenen findet nicht statt (5,38,40,69).

Mittels der derart markierten Erythrozyten konnte die Effektivität einer im eigenen Labor (58a) entwickelten Methode überprüft werden, mit der eine Auftrennung einer komplexen Erythrozytenpopulation bezüglich des Alters durch fraktionierte Zentrifugation durchgeführt werden kann. Diese Methode wurde zur Auftrennung der mit Schwermetallen (Hg, Ag) beladenen Erythrozyten herangezogen, um Hinweise auf Affinitätsunterschiede von alten und jungen Zellen gegenüber Hg und Ag zu erhalten.

Die Frage nach der osmotischen Resistenz alter und junger Erythrozyten wurde ebenfalls mit markierten (^{59}Fe) Zellen untersucht: Versuche von Wilbrand (86) an jungen gewaschenen Erythrozyten ergaben in hypotonischen Lösungen eine größere osmotische Resistenz als alte Zellen. Veröffentlichungen von Gruz und Steward (17) sprechen von einer geringeren Resistenz junger Zellen, während Prankerdt (65) gleiche osmotische Resistenz fand. Unsere Ergebnisse stimmen mit der Feststellung von Prankerdt durchaus überein.

Der gefundene Wert des Maximums der Hämolyse lag bei 0,52. Wirth (89) gibt 0,42 bis 0,52, Klienberger 0,5 bis 0,52 (50) und Albritton (3) 0,45 bis 0,57, jeweils % NaCl-Konzentration, als Maximum an.

V. Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurden die Schwermetallisotope ^{203}Hg und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ auf ihre Eignung für eine Erythrozytenlebenszeitbestimmung bzw. für die szintigraphische Darstellung innerer Organe (z.B. Milzszintigraphie) in den chemischen Verbindungen $^{203}\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ und $[\text{}^{110\text{m}}\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ durch In-vitro- und In-vivo-Versuche geprüft.

Mit Hilfe der an Rindererythrozyten durchgeführten In-vitro-Versuche stellten wir den Einfluß der Inkubationszeit und verschiedener Parameter (Plasma- und NaCl-Suspension, Temperatur, Lagerung und Trägerzusatz) auf die Inkubationsrate und -ausbeute fest und prüften diese Ergebnisse mittels statistischer Methoden (doppelte Varianzanalyse, doppelte Varianzanalyse mit Wiederholungen, Kovarianz- und Regressionsanalyse u.a.) auf Signifikanz.

Dabei ergab sich, daß die verwendeten Isotope - statistisch signifikant oder zumindest statistisch auffällig - irreversibel (Elution für $^{110\text{m}}\text{Ag}$ unter 1 %), mit fast maximaler Inkubationsausbeute ($^{110\text{m}}\text{Ag}$: 95 % bis 100 %) und in kurzer Inkubationszeit (5 min.) an die Erythrozytenbestandteile gebunden werden, so daß eine Verwendung zur Erythrozytenlebenszeitbestimmung möglich erschien.

Erst die unter Anwendung einer in unserem Labor entwickelten Mikromethode an Kaninchen durchgeführten 60 tierexperimentellen Untersuchungen ließen den Alterationseffekt, der bei der beschriebenen Markierung auftrat und der sich in einer baldigen Elimination der markierten Zellen aus der Blutbahn äußerte, erkennen.

Nach unserer Ansicht sind für dieses Verhalten zwei Faktoren - Erhöhung der Membranpermeabilität und heterotope Verteilung der Isotope auf die verschiedenen Altersfraktionen der gesamten Erythrozytenpopulation - verantwortlich.

Die erhöhte Membranpermeabilität gealterter Erythrozyten konnte durch Lagerungsversuche, die heterogene Verteilung bei Markierung mit ^{203}Hg und $^{110\text{m}}\text{Ag}$ unter Anwendung einer

eigens hierfür entwickelten Anreicherungs-methode, welche durch Vorversuche mit ^{59}Fe -markierten Erythrozyten geprüft wurde, nachgewiesen werden.

Eine im Zusammenhang mit diesen Vorversuchen durchgeführte Untersuchung ergab, daß junge und alte Erythrozyten die gleiche osmotische Resistenz aufweisen.

Die Elimination der Erythrozyten war bei Verwendung von ^{203}Hg statistisch gesichert größer als bei Markierung mit $^{110\text{m}}\text{Ag}$.

Die Anreicherung der Aktivität in verschiedenen Organen wurde an 21 Kaninchen untersucht. Es zeigte sich, daß bei Markierung mit ^{51}Cr und Beladung mit $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ und $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ als Träger die Milz die weitaus größte spezifische Aktivität aufwies. Bei Markierung mit $^{110\text{m}}\text{Ag}$ (^{203}Hg) war die Leber (Niere) das Organ mit der größten spezifischen Aktivität.

Den größten Anteil der insgesamt injizierten ^{203}Hg -($^{110\text{m}}\text{Ag}$)-Aktivität wiesen die Nieren (Leber) auf, wobei die Anreicherung in der Nierenrinde besonders hoch war.

L i t e r a t u r

- (1) Agranoff, B.W., B.L.Vallee and D.F.Waugh:
Blood 9, 804 (1954); entnommen aus Literaturangabe (61).
- (2) Aikawa, J.K., and R.H.Fitz: The distribution of ^{203}Hg -
labeled mercaptomerin in human tissues.
J.clin.Invest. 35, 775 (1956).
- (3) Albritton, E.C.: Standard values in blood.
W.B.Sauders Comp., Philadelphia and London (1955).
- (4) Allgöwer, M.: Untersuchungen zur Phagozytose der Leu-
kozyten.
Schweiz.med.Wschr. 77, 40 (1947).
- (5) Balfour, W.M., J.F.Ross, W.F.Bale, and G.H.Whipple:
Red cell volume, circulating and total, as determined
by radio-iron.
Science 93, 87 (1941).
- (6) Bechhold, H.: Bau der roten Blutkörperchen und Hämolyse.
Münch.med.Wschr. 68, 127 (1921).
- (7) Bernard, J., zitiert aus: Jaffé, R.: Anatomie und
Pathologie der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere. Berlin (1931).
- (8) Blumberg, H., and T.N.Carey: Argyremia. Detection of
unsuspected and obscure argyria by the spectrographic
demonstration of high blood silver.
J.Amer.med.Ass. 103, 1521 (1934).
- (9) Borghgraef, R R.M., R.H.Kessler and P.F.Pitts:
Plasma regression, distribution and excretion of
radiomercury in relation to diuresis following the
intravenous administration of ^{203}Hg labeled chlor-
merodrin to the dog.
J.clin.Invest. 35, 1055 (1956).
- (10) Braunsteiner, H.: Physiologie und Physiopathologie der
weißen Blutzellen. Thieme Verlag, Stuttgart (1959).
- (11) Brüscke, G. und K.Richter: Erythrozytenalterung und
osmotische Resistenz.
Zschr.ges.Innere Med. 13, 486 (1958).
- (12) Buckley, F.S.jr., M.J.Powell: Studies on permeability
of leucocytes.
J.Lab.clin.Med. 41, 108 (1953).

- (13) Burch, G., T.Ray, S.Threefoot, F.J.Kelly and A.Svedberg: The urinary excretion and biological decay periods of radiomercury labeling a mercurial diuretic in normal and diseased man.
J.clin.Invest. 29, 1131 (1950).
- (14) Burch, H.B., C.A.Storvick, R.L.Bilcknell, H.C.King: Coenzymes in human blood-cells.
J.Biol.Chem. 212, 898 (1955).
- (15) Bushel and Bing, zitiert nach Haam, E. aus: Jaffé, R.: Anatomie und Pathologie der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere. Berlin (1931).
- (16) Cavalli-Sforza, L.: Grundbegriffe der Biometrie. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart (1964).
- (17) Cruz, O.O., P.F.Hahn, W.F.Bale and W.M.Balfour: Effect of age on susceptibility of erythrocyte to hypotonic salt solutions. Radioaktive iron as means of tagging red blood cell.
Amer.J.med.Sci. 202, 157 (1941).
- (18) Danielli, J.F., H.Davson: A contribution to the theory of permeability of thin films.
J.cell.comp.Physiol. 5, 495 (1935).
- (19) Donohue, D.M., C.A.Finch and B.W.Gabrio: Erythrocyte preservation. VI. The storage of blood with purine nucleosides.
J.clin.Invest. 35, 562 (1956).
- (20) Donohue, D.M., B.W.Gabrio and C.A.Finch: Preservation and transfusion of blood.
J.Amer.med.Ass. 161, 784 (1956).
- (21) Duesberg, R. und J.Fischer: Die szintigraphische Darstellung der Milz als Ausdruck ihrer Lage und ihres Funktionszustandes.
Med.Klin. 59, 429 (1964).
- (22) Dumas, J.: Les animaux de laboratoire. Edition Medicales Flammarion. Paris (1953).
- (23) Ebaugh, F.G., Ch.P.Emerson, J.F.Ross: The use of radioaktive chromium⁵¹ as an erythrocyte tagging agent for the determination of red cell survival in vivo.
J.clin.Invest. 32, 1260 (1953).
- (24) Finch, S., C.Gibson, W.C.Peacock and R.G.Fluharty: Iron metabolism. Utilization of intravenous radioaktive iron.
Blood 4, 905 (1949).

- (25) Fischer, J. und R.Wolf: Ergebnisse der Szintigraphischen Darstellung der Milz nach Injektion von ^{51}Cr -markierten und wärmealterierten Erythrozyten.
43.Dtsch.Röntgenkongreß, Köln (1962).
- (26) Fischer, J. und R.Wolf: Die Szintigraphie der Milz mit ^{51}Cr
Bull.Schweiz.Akad.Med.Wiss. 19, 68 (1963).
- (27) Fischer, J. und R.Wolf: Die szintigraphische Darstellung der Milz mit Radiochrom (^{51}Cr).
Dtsch.med.Wschr. 88, 305 (1963).
- (28) Fischer, J. und R.Wolf: Die quantitative Abschätzung der Milzgröße mit Hilfe der Szintigraphie.
Dtsch.med.Wschr. 88, 1430 (1963).
- (29) Fischer, J. und R.Wolf: Grundlagen und Technik der Milz-szintigraphie (Stuttgart) 10, 209 (1963).
- (30) Freudenberg, K.: Grundriß der medizinischen Statistik.
F.K.Schattauer Verlag, Stuttgart (1962).
- (30a) Fleckenstein, A.: Aktuelle Probleme der Muskelphysiologie und ihre Analyse mit Isotopen. In: Künstliche Radioaktive Isotope in Physiologie, Diagnostik und Therapie, Bd II, 200 (1962).
- (31) Fujita, I., zitiert nach: Lang, K.: Physiologische Chemie der Blutzellen. Handbuch der gesamten Hämatologie, Aug. Feie, Bd I (1957).
- (32) Fukushima, S.: On the function, components and structure of human leucocytes.
J.clin.Invest. 34, 428 (1955).
- (33) Gabrio, B.W., D.M.Donohue and C.A.Finch: Erythrocyte preservation: V. Relationship between chemical changes and variability of stored blood treated with adenosine.
J.clin.Invest. 34, 1509 (1955).
- (34) Gabrio, B.M., C.A.Finch and F.M.Huennekens: Erythrocyte preservation: A topic in molecular biochemistry.
Blood 11, 103 (1956).
- (35) Gamill, J.C., B.Wheeler, E.L.Carothers and P.F.Hahn: Distribution of radioactive silver colloids in tissues of rodents following injection by various routes.
Pro.Soc.exp.Biol. 74, 691 (1950).
- (36) Gehrman, G., P.Grobel: Erythrozytendestruktion, Lokalisation der Hämolyse und Indikation zur Splenektomie bei hämolytischen Anämien.
Dtsch.med.Wschr. 87, 76 (1962).
- (37) Giebisch, G. and P.J.Dorman: Comparative study of uptake and distribution of ^{203}Hg given as labelled chloromedrin (Neohydrin).
Proc.Soc.exp.Biol. 98, 50 (1958).

- (38) Govaerts, J. et A.Lambrechts: Interaction in vitro du radiofer du plasma avec le fer des globules rouges. Acta biol.Belg. 24, 209 (1943).
- (39) Gray, S.J., K.Sterling: The tagging of red cells and Plasma proteins with radioactive chromium. J.clin.Invest. 29, 1604 (1950).
- (40) Hahn, Bale, Ross, Hettig, Whipple: Radioiron in plasma does not exchange with hemoglobin iron in red cells. Science 92, 131 (1940).
- (41) Harris, H., Brit.J.exper.Path. 34, 279, 599 (1953). Entnommen aus: Handbuch der gesamten Hämatologie, Aug.Feie, Bd I (1957).
- (42) Heimpel, H., W.Keiderling, W.Schoeppe, H.Reichold, G.Hoffmann: Untersuchungen zur Bestimmung der Erythrozytenüberlebenszeit und des Abbaortes der Erythrozyten bei Gesunden mit Hilfe der ^{51}Cr -Markierung in vitro und in vivo. Nucl.-Med. (Stuttgart) 2, 217 (1962).
- (43) Hennig, K., W.-G.Franke, P.Woller und P.Knoll: Bisherige Erfahrungen bei der Milzszintigraphie mit Brommerkuri-Hydroxypropan (BMHP- ^{197}Hg). Nucl.-Med. IV: 370 (1965)
- (44) Hooper, C.W., and C.N.Meyers: Histopathologic and blood studies with silver-salvarsan. J.Lab.clin.Med. 10, 208 (1925)
- (45) Horst, W., C.Schneider und H.Villanueva-Meyer: Die szintigraphische Darstellung der Milz mit ^{51}Cr -markierten, wärmebeschädigten roten Blutzellen und Untersuchungen über die quantitative Verteilung des ^{51}Cr im Organismus. Radio-Isotope in der Hämatologie, 249. Friedrich-Karl Schattauer, Stuttgart (1963).
- (46) Jandl, J.H., M.S.Greenberg, R.H.Yonemoto, W.B.Castle: Clinical determination of the sites of red cell sequestration in hemolytic anemias. J.clin.Invest. 35, 842 (1956).
- (47) Johnson, Ph.M., J.C.Herion, S.L.Mooring: Scintillation scanning of the normal human spleen utilizing sensitized radioactive erythrocytes. Radiology 74, 99 (1960).
- (48) Jung, F.: Strukturprobleme am roten Blutkörperchen. Naturwiss. 37, 229 (1950).
- (49) Kahn, J.B.jr., and S.B.Cohen: Effect of ribosides and related compounds on cation transport in cold stored human erythrocyte. J.pharmacol.exp.Ther. 120, 9 (1957).

- (50) Klienberger, C.: Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. 2.Aufl., Leipzig (1927).
- (51) Koller, S.: Statist.Auswertungsmethoden, in: Biochemisches Taschenbuch, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, Bd 2, 959 (1964).
- (52) Linder, A.: Statist. Methoden. Dritte Auflage, Birkhauser Verlag, Basel und Stuttgart (1960).
- (53) Löhr, G.W., H.D.Waller, O.Kanges, B.Schlegel und A.A.Müller: Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrozyten. Klin.Wschr. 36, 1008 (1958).
- (54) Löhr, G.W. und H.D.Waller: Zellstoffwechsel und Zellalterung. Klin.Wschr. 37, 833 (1959).
- (55) Loutit, J.F., P.L.Mollison and Maureen Young: Citric acid-sodium citrate-glucose mixtures for blood storage. Quant.J.exp.Physiol. 32, 183 (1943).
- (56) Meldrum, N.V. and F.J.W.Roughton: Carbonic anhydrase. Hs preparation and properties. J.Physiol. 80, 113 (1933).
- (57) Mundschenk, H. und J.Fischer: Über das Verhalten von mit 1-Brommercuri-2-hydroxypropan (BMHP) beladenen Erythrozyten im Tierversuch. Nucl.-Med. V: 355 (1966).
- (58) Mundschenk, H.: Arbeitsbericht zum Thema: Untersuchungen über den Einbau ausgewählter Radioisotope in Erythrozyten (II) (unveröffentlicht).
- (58a) Mundschenk, H.: Unveröffentlichte Arbeiten.
- (59) Mustakallio, K.K., and A.Telkkä: Histochemical localization of the mercurial inhibition of succinic dehydrogenase in rat kidney. Science 118, 320 (1953).
- (60) Necheles, T.F., I.M.Weinstein, G.V.Leroy: Radioactive sodium chromate for the study of survival of red blood cells. J.Lab.clin.Med. 42, 358 (1953).
- (61) Netter, R. et G.Barski: Ann.Inst.Pasteur. Paris 80, 311 (1951). Entnommen aus: Braunsteiner, H.: Physiologie und Physiopathologie der weißen Blutzellen. Thieme Verlag, Stuttgart (1959).
- (62) Piper, W., G.Ruhenstroth-Bauer: Untersuchungen über die Proteinadsorption an menschlichen Erythrozyten. Klin.Wschr. 34, 11 (1956).
- (63) Pranker, T.A.J.: Red-cell structure and metabolism in haemolytic anaemia. Brit.med.Bull. 15, 54 (1959).

- (64) Prankerd, T.A.J.: The red cell. An account of its chemical physiology and pathology. Oxford Blackwell (1961).
- (65) Prankerd, T.A.J.: The aging of red cells. J.Physiol. 143, 325 (1958).
- (66) Pribilla, W., W.Ernst, W.Rottger: Hämatologische Untersuchungen mit radioaktivem Chrom. Klin.Wschr. 37, 23 (1959).
- (67) Rapoport, S.: Dimensional, osmotic, and chemical changes of erythrocyte in stored blood. I. Blood preserved in sodium citrate, neutral, and acid-citrate-glucose (ACD) mixtures. J.clin.Invest. 26, 591 (1947).
- (68) Ray, C.T., G.E.Burch, S.A.Threefoot and F.J.Kelly: The distribution of radiomercury of a mercurial diuretic in some of the body fluids of man. Amer.J.med.Sci. 220, 160 (1950).
- (69) Ross, J.F., C.A.Finch, W.C.Peacock and M.E.Sammons: The in vitro preservation and posttransfusion survival of stored blood. J.clin.Invest. 26, 687 (1947).
- (70) Ruhenstroth-Bauer, G.: Die Struktur des Säugetiererythrozyten. Handbuch der ges. Hämatologie, Bd I, S.210. Urban und Schwarzenberg, München-Berlin (1959).
- (71) Sjövall, H.: Diss., Lund (1936). Zitiert nach: Schermer, S. Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. 2.Aufl., Joh. Ambrosius Barth-Verlag, Leipzig (1958).
- (72) Smith, G.: Some enzymologic aspects of human blood cells. Biochem.biophysica acta 3, 44 (1949).
- (73) Schermer, S.: Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. 2.Aufl., Joh.Ambrosius Barth-Verlag, Leipzig (1958).
- (74) Schloesser, L.L., D.R.Korst, D.V.Clatanoff, R.F.Schilling: Radioactivity over the spleen and liver following the transfusion of chromium ⁵¹-labelled erythrocytes in haemolytic anaemia. J.clin.Invest. 36, 1470 (1957).
- (75) Schmidt, H.A.E., H.Schmitt, W.Keiderling, M.Matthes und W.Feiser: Die Radiochrommarkierung als Mittel zur Wertigkeitsbestimmung von Blutkonserven. I.Mitt.: Der Einbau von Na₂⁵¹CrO₄ in frische und gelagerte Erythrozyten. Acta hæmat. 423, 97 (1960).
- (76) Schwartz, K.-D., P.Knoll und D.Hamann: Eine neue Methode zur szintigraphischen Darstellung der Milz mit Brommercuryhydroxypropan (197Hg-BMHP). Dtsch.Gesundh.-Wes. 20, 737 (1965).

- (77) Stewart, F.W., and F.Parker: So-called endothelial blockade with collargol; immunologic and histologic study. *Amer.J.Path.* 2, 381 (1926).
- (78) Threefoot, S.A., C.T.Ray, G.E.Burch, J.A.Cronvich, J.P. Milnor, W.Overman and W.Gordon: Concentrationtime course in the plasma of man of radiomercury introduced as a mercurial diuretic. *J.clin.Invest.* 28, 661 (1949).
- (79) Tullis, J.L.: Blood 8, 891 (1952): Zitiert nach: Braunsteiner, H.: Physiologie und Physiopathologie der weißen Blutzellen. Thieme Verlag, Stuttgart (1959).
- (80) Wagner, H.N.jr., J.G.Mc Afee, I.M.Weiner, M.Ilio, J.Martinez und W.P.Caine jr.: The use of Hg-203 labelled bromomercuri-hydroxypropane (BMHP) in radioisotope scanning of the spleen. *J.nucl.Med.* 4, 190 (1963).
- (81) Wagner, H.N.jr., I.M.Weiner, J.G.McAfee und J.Martinez: 1-Mercuri-2-hydroxypropane (MHP). *Arch.Int.Med.* 113, 696 (1964).
- (82) Waugh, D.F., F.O.Schmitt: Investigation of the thickness and ultrastructure of cellular membranes by the analytical leptoscope. *Cold.Spr.Harb.Symp.quant.Biol.* 8, 233 (1940).
- (83) Weber, E.: Grundriß der Biologischen Statistik. Fünfte Auflage, Fischer Verlag, Jena (1964),
- (84) West, H.D., R.R.Elliot, A.P.Johnson and C.W.Johnson: In vivo localization of radioactive silver at predetermined sites in tissues. *Amer.J.Roentgenol.* 64, 831 (1950).
- (85) West, H.D., A.P.Johnson and C.W.Johnson: The use of radioactive silver for the detection of abscesses and tumors. I. The concentration of ^{111}Ag in spontaneous and experimentally induced abscesses. *J.Lab.clin.Med.* 34, 1376 (1949).
- (86) Wilbrand, W.: Die Permeabilität der Zelle. *Erg.Physiol.* 204, 40 (1938).
- (87) Winkelmann, J.W., H.N.Wagner jr., J.G.McAfee und J.M.Mozley: Visualization of the spleen in man by radioisotope scanning. *Radiology* 75, 465 (1960).
- (88) Winkler, K.C., H.G.Bungenberg de Jong: Structure of the erythrocyte membrane. *Arch.neerld.Physiol.* 25, 430 (1941).

- (89) Wirth, D.: Grundlagen einer klinischen Hämatologie der Haustiere. 2.Auflage. Wien und Innsbruck (1950).
- (90) Wolpers, C.: Zur Feinstruktur der Erythrozytenmembran. Naturwiss. 29, 416 (1941).
- (91) Zum Winkel, K.: Praktische Möglichkeiten der Szintigraphie. Röntgen-Bl. 15, 42 (1962).
- (92) Zum Winkel, K. und A.Kluge: Szintigraphie und Funktionsprüfung der Milz mit alterierten Erythrozyten; Radioisotope in der Hämatologie, 239. Friedrich-Karl Schattauer, Stuttgart (1963).

L e b e n s l a u f

Am 17. Juni 1940 wurde ich als drittes Kind der Eheleute Richard Bangard und Marie Bangard, geb. Treude, in Siegen/Westfalen geboren.

Von 1947 bis 1952 besuchte ich die dortige Volksschule und anschließend neun Jahre das Städtische Gymnasium Siegen, an dem ich 1961 das Abitur bestand.

Im gleichen Jahr - 1961 - begann ich mein Studium in Mainz und legte dort die naturwissenschaftliche und die ärztliche Vorprüfung ab. 1964 wechselte ich für die Dauer eines Semester zur Universität Wien. Nach elfsemestrigem Studium meldete ich mich zum Staatsexamen in Mainz, das ich am 24. Januar 1967 bestand. Nunmehr absolviere ich meine Medizinalassistentenzeit.

Herrn Privatdozenten Dr. med. Joseph F i s c h e r
danke ich für die Überlassung des Themas sowie für
die Förderung, die er der Arbeit hat zu Teil werden
lassen.

Dem Direktor der I. Medizinischen Klinik und Poli-
klinik, Herrn Professor Dr. med. Richard D u e s -
b e r g , danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. rer. nat. H. M u n d s c h e n k - Leiter
des Radiochemischen Laboratoriums der I. Medizinischen
Klinik und Poliklinik - danke ich für die wissen-
schaftliche Beratung in vielen Fragen der Arbeit.

Herrn Dr.med. H. F a s s l - Institut für Medizinische
Statistik und Dokumentation (Direktor: Prof. Dr. Koller) -
danke ich für die Beratung bei der statistischen Aus-
wertung.

